UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1940-1941. — N° 315

L'ÉLECTROLYSE EN COURANT ALTERNATIF INDUSTRIEL DES SUSPENSIONS MICROBIENNES EN EAU PURISSIME

Contribution à l'Étude des méthodes de préparation de l'eau de conductivité

Appréciation de la teneur en germes d'une émulsion microbienne par microdosage de l'azote

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le samedi 22 février 1941

PAR

René-Amand-Émile NIAUSSAT

Né à JONZAC (Charente-Inférieure), le 15 février 1912

Examinateurs de la Thèse

MM. AUBERTIN, professeur ..... *Président.*
CHELLE, professeur .....
WANGERMEZ, professeur ..... *Juges.*
CASTAGNOU, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1941

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536526_0007

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1940-1941. — N° 315

L'ÉLECTROLYSE
EN COURANT ALTERNATIF INDUSTRIEL
DES
SUSPENSIONS MICROBIENNES EN EAU PURISSIME

Contribution à l'Étude des méthodes de préparation de l'eau de conductivité

Appréciation de la teneur en germes
d'une émulsion microbienne par microdosage de l'azote

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention " PHARMACIE "

présentée et soutenue publiquement le samedi 22 février 1941

PAR

René-Amand-Émile NIAUSSAT

Né à JONZAC (Charente-Inférieure), le 15 février 1912

Examinateurs de la Thèse

MM. AUBERTIN, professeur ..... *Président.*
CHELLE, professeur .....
WANGERMEZ, professeur ..... *Juges.*
CASTAGNOU, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1941

FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.
ASSESSEUR : M. LABAT.
DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. MOURE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CHAVANNAZ, C. SIGALAS, SABRAZÈS, BÉGOUIN, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	N.
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurgicale et gynécologique	N.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants	CRUCHET.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Anatomie pathol. et microscopie clinique	DAMADE.	Physique médicale et pharmaceutique	WANGERMEZ.
Anatomie	VILLEMIN.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques.	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques	N.
Hygiène	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires.	DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales.	N.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	CREYX.
Pharmacie	VITTE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.		

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY, CHARRIER (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	MAGENDIE.
Physiologie	FRANCK.	id.	POUYANNE.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	Obstétrique	RIVIÈRE.
id.	DELMAS-MARSALET.	id.	MAHON.
id.	DE GRAILLY.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	FONTAN.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	BROUSTET.	Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
id.	DERVILLÉE.	Physique médicale	AURIAC.
id.	SARIC.	Chimie générale pharmacent. et toxicologie	CASTAGNOU.
id.	DUBARRY.	Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD.
Chirurgie générale	LOUBAT.	Pharmacie	MESNARD.
id.	MASSÉ.	id.	GRANGER.
id.	DARGET.	Histoire natur. médicale et parasitologie	R. MANDOUL.

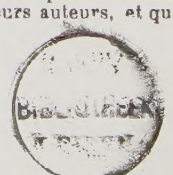
COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	JEANNENEY.	Ophtalmologie	CABANNES (en congé).
Accouchements	RIVIÈRE.	Physique médicale et pharmaceut que	AURIAC.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Anatomie	J. BEAUVIEUX.
Puériculture	FAUGÈRE.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.	Botanique	GIRARD.
Médecine légale	DERVILLÉE.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	DARGET.	Bactériologie	MOUREAU.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	N.

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation



A TOUS LES MIENS

A Monsieur R. DESPLATS

Ingénieur A. M. et I. E. G.,
Directeur de la Compagnie Electro-Salvator.

Qui a bien voulu me guider dans mes expériences d'électrolyse et, par le prêt de nombreux appareils, m'a permis de mener à bien ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur HORRENBERGER

Ancien Médecin-Chef du Laboratoire de Bactériologie et Sérologie de la 18e Région,
Chef de service à l'Institut Pasteur d'Alger.

Vous m'avez enseigné l'hématologie et la sérologie.

Dans votre laboratoire, grâce à vos conseils éclairés, je me suis perfectionné en bactériologie. Je voudrais que ce travail soit une faible expression de toute ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur MOUREAU

Assistant du Laboratoire de Médecine expérimentale,
Chargé du Cours de Bactériologie,
Croix de guerre.

A Monsieur le Professeur agrégé CASTAGNOU

Chargé du Cours de Chimie générale pharmaceutique et Toxicologie.

Qui m'a sans compter prodigué ses conseils, m'a si souvent aidé dans mes expériences et à qui je dois tant pour l'élaboration de cette thèse.

Que celle-ci soit un témoignage de ma gratitude et de mon entier dévouement.

AUX MEMBRES DE MON JURY DE THESE

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur E. AUBERTIN

Professeur de Médecine expérimentale,
Médecin des Hôpitaux,
Croix de guerre,
Officier d'Académie.

Mon cher Maître,

Permettez-moi de vous dire combien je suis fier d'être votre élève et combien je vous en suis profondément reconnaissant.

Vous m'avez accepté dans votre laboratoire, et, après m'avoir initié à la bactériologie, vous avez bien voulu me donner le sujet de cette thèse. Dans la suite, vous n'avez cessez de me montrer l'intérêt que vous portiez à mes recherches et vous me les avez facilitées par vos si utiles conseils. Mais surtout, par votre constant exemple, vous m'avez donné le goût du travail désintéressé et de la persévérance dans l'effort.

Que cet ouvrage soit la modeste expression de ma gratitude et de ma profonde admiration.

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder notre sujet, nous voudrions témoigner notre reconnaissance à tous ceux qui nous ont guidé et qui ont facilité notre tâche.

Que notre Maître, M. le Professeur Aubertin, nous permette de le remercier de l'accueil qu'il nous fit dans son laboratoire, des conseils qu'il nous a toujours prodigués et de l'intérêt qu'il n'a pas cessé de nous montrer. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de toute notre respectueuse gratitude.

Nous remercions également notre ami M. le Professeur agrégé Castagnou, qui, sans compter, pendant plus de deux ans que nous avons passés près de lui au Laboratoire, nous a aidé de ses précieux conseils et nous a dispensé largement son aide manuelle. Qu'il soit assuré de notre respectueuse affection.

Nos remerciements s'adressent aussi à M. le Docteur Moureau, auprès de qui nous avons toujours trouvé un si bon accueil et qui a bien voulu nous prêter les souches microbiennes nécessaires à nos expériences. Nous lui en gardons une grande reconnaissance.

Merci également à Mlle Cristobal, à Mme Castagnou et à Mlle Saint-Pastous, dont le travail a contribué à faciliter nos expériences.

L'ÉLECTROLYSE
EN COURANT ALTERNATIF INDUSTRIEL
DES
SUSPENSIONS MICROBIENNES EN EAU PURISSIME

INTRODUCTION

En étudiant le pouvoir bactéricide d'une solution d'hypochlorites alcalins, préparée en électrolysant en courant alternatif industriel une solution saline, nous avons cherché à savoir si l'eau utilisée pour la préparation devenait stérile.

En particulier, en examinant des eaux fortement souillées, nous nous sommes aperçu que l'électrolyse de la solution saline ne conférait pas la stérilité au soluté d'hypochlorite obtenu.

Ce qui a retenu notre attention, c'est que l'intensité électrolytique varie en fonction du nombre de germes contenus dans l'eau et de l'espèce microbienne mise en cause.

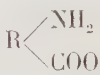
Frappé par ces faits, nous avons alors pensé qu'il serait intéressant d'étudier :

L'électrolyse en courant alternatif industriel des suspensions microbiennes en milieu ne conduisant pratiquement pas le courant.

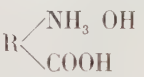
Les microbes, comme toutes les matières protéiques, sont des colloïdes électrolytiques pour lesquels la charge des

micelles est une charge de valence. Mais, ainsi que l'a montré Loeb [99], ils sont d'une nature particulière. Alors qu'à pH constant les protéines sont capables de se combiner à des cations ou des anions étrangers selon les lois ordinaires des cristalloïdes électrolytiques; à pH variable, elles se conduisent comme des ampholytes et possèdent à la fois des fonctions acides ou basiques.

En effet, au point de vue chimique, les protéines sont des composés qui, par hydrolyse, donnent une ou plusieurs sortes d'acides aminés. On peut donc les représenter ainsi :



Ces corps par hydrolyse dans l'eau donnent :



Par leur fonction amine (NH_2), les protéines peuvent donc se combiner avec les acides. Par leur fonction carboxyle (COOH), elles peuvent se combiner avec les bases.

C'est l'existence simultanée de fonctions acides et alcalines qui place ces substances dans le cas particulier des ampholytes.

Or, le fait essentiel qui caractérise les ampholytes réside dans l'impossibilité de leur dissociation simultanée en ions H+ et OH—.

En effet, c'est la réaction du milieu qui régit la libération soit des ions acides, soit des ions alcalins. Dans un milieu de pH très bas, donc fortement acide, la loi d'action de masse nous indique que la fonction alcaline sera très favorisée par suite du manque de OH du milieu, alors que la libération des ions H+ sera fortement empêchée et même bloquée.

En milieu acide, la molécule protéinique sera donc *électropositive* et se portera vers le pôle négatif. Inversement, dans un milieu de pH élevé, donc fortement alcalin, c'est le phénomène inverse qui se produira. Les OH du milieu alcalin

bloqueront ceux de l'ampholyte, alors que la fonction acide de ce dernier aura toute facilité d'émettre ses ions H.

En milieu alcalin, la molécule protéinique sera donc *électro-négative* et se portera vers le pôle positif.

Il s'ensuit que souvent, pour pH compris entre ces deux cas extrêmes, l'ampholyte doit avoir ses deux fonctions également dissociées; dans ces conditions, il est en quelque sorte « hermaphrodite » (Vlès [150]), c'est-à-dire électriquement neutre.

Si à ce stade intermédiaire on le soumet à l'électrolyse, il ne se comporte ni comme un anion ni comme un cathion : il reste indifférent. Ce point de transport électrique nul est dit « *point isoélectrique* ». Il est caractérisé par la valeur que présente la réaction du milieu (pH isoélectrique : pHi). Il est à remarquer que ce point ne coïncide généralement pas avec la neutralité chimique du milieu. Il a une valeur spécifique pour chaque ampholyte et il se présente en général comme un point critique pour les propriétés de l'ampholyte. Pour les protéines en particulier (Loeb), il correspond à un minimum de solubilité, à un maximum d'instabilité en solution (floculation), à un minimum de viscosité, à une affinité minima de combinaison avec les autres électrolytes, à un maximum ou un minimum de propriétés optiques (pouvoir rotatoire, diffusion, etc.). Nous avons déduit de ces propriétés que l'électrolyse des émulsions microbiennes devait sûrement nous donner, dans des conditions d'expérience toujours identiques, une méthode de diagnostic des différents microbes.

Mais, nous adressant à des émulsions, c'était la charge même des bactéries qui allait être le facteur primordial de l'établissement des courbes différentielles. En effet, la stabilité des suspensions est principalement sous la dépendance de la charge électrique des particules, ici des bactéries. Or, la charge électrique d'un germe est essentiellement variable : elle dépend de l'âge des microbes, du milieu dans lequel ils ont cultivé, du liquide dans lequel ils sont en sus-

pension. Il faut donc, si l'on veut déterminer aussi exactement que possible les propriétés physico-chimiques de chaque germe, se placer dans des conditions expérimentales constantes et identiques.

Dans notre cas, il nous a fallu préparer un milieu de suspension toujours le même : l'eau purissime; il a fallu déterminer si la concentration des germes jouait un rôle dans l'électrolyse, et, pour cela, utiliser un procédé de dénombrement aussi exact que possible; enfin, il a fallu imaginer un appareil électrolytique d'emploi facile et donnant des résultats sérieux.

Notre travail comprend donc trois chapitres principaux :

— le premier traite de l'eau purissime et de sa préparation;

— le second étudie les méthodes de détermination de la teneur en germes des émulsions microbiennes et expose en détail la méthode imaginée et utilisée dans nos expériences;

— le troisième expose notre méthode d'électrolyse, le détail de la technique utilisée et les résultats obtenus.

Ces trois chapitres sont précédés d'un chapitre de généralités et d'historique et suivis d'un chapitre de discussion et d'interprétation des résultats.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Les premières expériences relatives à l'action du courant électrique sur les suspensions microbiennes remontent à la fin du siècle dernier.

C'est en 1864, d'après Dale [32], que Kuhne remarqua le premier que des bacilles mobiles, placés dans un champ électrique, s'orientent instantanément dans le sens du courant. Mais Lortet [101], en 1896, reprenant la question, fit les premières observations vraiment intéressantes. Il signala que les « bactéries, sous l'influence du courant, ne se touchent point bout à bout comme des corps polarisés devraient le faire, mais se placent parallèlement entre elles et au courant; que celui-ci n'a aucune action sur leur vitalité et enfin que les microbes vieillis ou soumis à l'action d'une substance antiseptique ne s'orientent plus sous l'influence du courant ». En 1904, Neisser et Friedmann [114], Bechold [10] et, en 1905, Carlgren [18], étudièrent le transport électrique des microbes qu'ils appelèrent « galvanotropisme ». Les premiers, ils ont indiqué le signe de l'électrisation des bactéries : à l'œil nu, ils aperçurent l'éclaircissement des suspensions microbiennes au voisinage de la cathode et en conclurent que les bactéries vont à l'anode. Quant aux bacilles imprégnés d'agglutinine, ils sont précipités par le courant entre les électrodes.

Ces premières expériences d'électrophorèse macroscopique furent suivies en 1906 d'expériences microscopiques dues à Cotton et Moutton [31]. Ces auteurs mirent au point une méthode simple et précise d'électrophorèse microscopique. S'étant aperçus que le mouvement des microbes en suspen-

sion s'établit dès qu'on ferme le circuit, ils imaginèrent d'utiliser une force électromotrice alternative. « Ils virent alors chaque point lumineux se transformer en une droite plus brillante à ses extrémités : les particules se mettent à vibrer dans le champ alternatif ainsi produit. » D'autre part, ces auteurs indiquèrent que seule la mise au point sur la partie centrale de la préparation donnait le sens exact du déplacement, au contact des parois le transport se faisant en sens inverse. Cette même année, V. Henri et Mlle Cernovodeanu [71], employant le procédé microscopique, étudièrent le transport électrique de différents germes : bacille typhique, coli, dysentérique de Flexner, staphylocoque doré, bacille du charbon, bacille tuberculeux, bacille de la fléole. Ils trouvèrent que seul le bacille de Flexner a une charge positive, tous les autres étant chargés négativement.

En 1907, Teague et Buxton [144] utilisèrent pour leurs expériences d'électrophorèse le tube en U de Béchold, mais ils le complétèrent par deux étranglements, afin que les électrodes plongent dans l'eau pure et que soient ainsi diminués les effets d'électrolyse. Par ce procédé, toutes les bactéries se dirigent vers un des pôles, même celles chargées d'agglutinine : il n'y a plus de précipitation entre les deux électrodes.

Ces auteurs observèrent en outre, avec le bacille pyocyanique, le renversement du signe des bactéries à la suite du changement de réaction du milieu.

A partir de ce moment, les travaux sur la cataphorèse microbienne furent très nombreux. Citons en 1907 ceux de Field et Teague [54], de Friedberger et Eisler [56], de Bancroft [7]; en 1908, de J.-F. Abbott [1]; en 1909, de C. Russ [130], qui donna même une technique de recherche du B. K. dans l'urine par passage d'un courant électrique; en 1910, ceux de Thornton [145]; en 1914, ceux de R. Hober [73], qui montra que les levures placées dans un champ électrique se comportent comme les microbes (observation confirmée en 1921 par Szent-Gyorgyi [142]).

En 1918, Girard et Audubert [60] montrèrent que la charge microbienne dépend de l'action des ions métalliques polyvalents. En ajoutant à une émulsion microbienne des ions de Lanthane, La $^{+++}$, ils abaissèrent et même annulèrent la charge microbienne : ils prouvaient ainsi que les ions des milieux de culture sont capables de modifier les charges des bactéries.

En 1920, Govaert [62], étudiant le comportement du bacille Coli vis-à-vis d'un champ électrique, confirma la charge négative de ce germe. Lasseur, en 1921, puis plus tard, de 1928 à 1934, aidé de ses collaborateurs, Mlle Dupaix, P. Jouffroy et R. Fribourg [85 à 92], étudia systématiquement par les procédés macroscopique et microscopique le signe de nombreux microbes et en particulier du bacille typhique, paratyphique A, dysentérique de Shiga et Flexner, du bacille coli, du pneumobacille. Ils trouvèrent, contrairement aux expériences de Henri et Cernovodeanu, que tous ces germes étaient chargés négativement. Cependant, en 1923, Cluzet, Rochaix et Kofman [27], puis, en 1927, Kofman [81] seul, confirmèrent la charge négative de tous les microbes, à l'exception des trois bacilles dysentériques (Shiga, Hiss et Flexner) et des paratyphiques B, qui sont chargés positivement. Quant au para-A et aux *Bacillus faecalis alcaligènes*, ils seraient d'après eux indifférents ou changeraient de signe suivant l'âge et le milieu de culture.

A partir de 1927, les travaux sur la cataphorèse deviennent de plus en plus nombreux, et ce fut l'étude du signe électrique de nombreux virus qui fut entreprise. En 1929, Olitzki et Long [116] trouvèrent que le virus de la vaccine est négatif. Findlay [58] signala comme négatif entre pH 6,6 et 8 le virus de la variole aviaire. Sichert et Modrow [135] trouvèrent le virus aphteux négatif entre pH 7 et 8,2.

Quant au virus herpétique, il est négatif entre pH 6,8 et 7,8 d'après Nicolau et Kopciowska [115].

En 1931, Levaditi et Lépine [95] trouvèrent, contrairement à Olitsky, que le virus de la vaccine est tantôt positif, tantôt

négatif. Ils essayèrent d'autre part de rechercher par électrophorèse le virus poliomyélitique dans la moelle, mais n'y parvinrent pas. Par contre, Louis Marmier et Victor Grysez [103] arrivèrent à purifier par ce procédé un bactériophage : à pH 7, ce bactériophage est négatif.

Cette même année, Kligler et Olitzki [78], étudiant les virus des divers typhus, les trouvèrent tous négatifs à pH compris entre 6 et 8,6.

En 1932, Olitzki [117], continuant ses travaux de cataphorèse, étudia alors la charge des antigènes et des anticorps. Il constata que l'antigène H du protéus X 19 est négatif pour pH 12 à 4,4, alors que l'antigène O du même protéus est négatif pour pH 12 à 3,4. La séparation se fait à pH 4. Il remarqua d'autre part que l'agglutinine antityphique est amphotère dans le sérum, mais devient négative lorsqu'on la sépare des protéines du sérum. Il en conclut que « la charge électrique d'un sérum immunisant est déterminée par ses protéines et non par ses anticorps ».

Cette même année, Walter Kross et Margarett Zuelzer [84], étudiant la charge électrique des spirochètes, conclurent qu'ils sont chargés négativement et que chaque souche possède une charge différente.

En 1934, Guardabassi [68] constata, après cataphorèse du bactériophage anti-shiga, que l'activité du liquide cathodique est supérieure à celle du liquide anodique. D'autre part, il isola le virus tuberculeux du sang humain par cataphorèse et s'aperçut que ce liquide anodique tuberculinise le cobaye.

En 1933, Mlle Choucroun [23] fit connaître son « dispositif correct d'électrophorèse », permettant des mesures quantitatives précises. La première, elle constata que l'électrisation n'est pas uniforme le long de la surface d'un microbe : en effet, si l'on inverse le sens d'un champ électrique, le germe fait une sorte de tête à queue afin de porter toujours la même extrémité vers l'électrode qui l'attire. Mlle Choucroun [24-25] signala, d'autre part, en 1936, la grande différence de mobilité dans un champ électrique entre les divers

bacilles d'une même émulsion : cette observation lui permit de trouver au milieu d'une « espèce bactérienne sauvage » plusieurs types de germes caractérisés au point de vue de leur électrisation par une « courbe de répartition fixe pour le type considéré ». Cet auteur montrait ainsi que l'électrisation superficielle est un caractère spécifique de l'espèce bactérienne, caractère important, car, grâce à cette nouvelle méthode, nous avons maintenant « un moyen commode et rapide de saisir ou de suivre, en dehors des tests biologiques, les modifications spontanées ou provoquées qui peuvent se produire ».

Mlle Choucroun observa enfin que les microbes défendent énergiquement leur charge et qu'il est très difficile, sinon impossible, de la modifier tant qu'ils sont vivants. Avec M.-A. Guillermond [69], elle fit la même constatation sur les cellules végétales : « tant que la cellule est vivante, aucun mouvement ne se produit dans son intérieur sous l'action du champ électrique », c'est seulement lorsque la cellule est tuée que les éléments chargés qui se trouvent à son intérieur commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique. Neipp [113], en 1937, a confirmé cette observation : étudiant l'action du nitrate de Lanthane sur le croît microbien, il conclut que « l'addition de nitrate de Lanthane à des doses qui exaltent la poussée microbienne ou qui lui sont indifférentes ne modifie pas sensiblement la charge électrique des bacilles. On n'observe de variations appréciables de charge que pour les concentrations de Lanthane qui altèrent ou tuent les germes ».

A côté de ces travaux de cataphorèse pure, nous devons signaler ceux qui s'en rapprochent. De nombreux auteurs, en effet, ont cherché à déterminer le rôle de certains facteurs sur l'électrisation microbienne. Nous avons déjà cité les travaux de Cluzet, Rochaix et Kofman, en 1923, ayant trait à l'influence de l'âge de la culture. D'après ces auteurs, la valeur des charges électriques est fonction de l'âge des cultures ayant servi à la préparation des émulsions. En

1934, A. Cardin [17] observa que le bacille coli se transporte moins rapidement dans un champ électrique lorsqu'on utilise des cultures âgées. Neipp, en 1937, au contraire, constata que des cultures d'un certain âge avaient une charge augmentée se traduisant par une plus grande vitesse des germes dans le champ électrique.

D'autres auteurs ont étudié l'influence de la concentration en germes : en 1933, Lasseur et Fribourg signalèrent que la vitesse de transport varie très peu avec la concentration de l'émulsion microbienne à condition d'opérer à un pH = 7, la vitesse de transport variant dans les zones plus acides ou plus alcalines. En 1935, Seigneurin [134] trouve que les germes chargés négativement ont leur vitesse qui diminue jusqu'à une concentration voisine de 1 milliard par centimètre cube, au-dessus de laquelle elle reste constante et caractéristique d'un germe donné. Il en conclut que « la vitesse d'électrophorèse des microbes varie avec la concentration en germes des suspensions suivant des fonctions relativement simples ». En 1937, Neipp, confirmant les travaux de Lasseur et Fribourg, déclare au contraire que la vitesse du transport électrique des bactéries est indépendante de la concentration en germes des émulsions.

La question du rôle joué par la concentration en électrolytes de la suspension microbienne a été aussi étudiée. En 1923, Winslow, Falk et Caulfield [152] ont observé que la réaction du milieu règle le déplacement des germes vers l'anode, lequel est ralenti par la présence des sels neutres. En 1924, Winslow et Shanghnessy [153] ont remarqué, en faisant des expériences sur le *Bacillus cereus*, que, dans le champ électrique, la vitesse de déplacement s'accroît de pH 3 à pH 10 et qu'au-dessus de cette valeur la vitesse de déplacement vers l'anode décroît. En 1935, M. Talenti et D. Léonardi [143], étudiant l'action des changements de pH dans les milieux de culture sur la charge électrique de certains microbes, ont constaté que la charge électrique reste la même, c'est-à-dire que les germes électro-positifs restent

tels, ainsi que les germes électro-négatifs, mais ils ont remarqué pour un certain pH, qui doit correspondre au pHi des microbes en expérience, un ralentissement très net de la vitesse des germes.

La conductibilité électrique des émulsions microbiennes a été, elle aussi, très étudiée. En 1928, Lasseur et Noblat [86] ont constaté que des lavages successifs diminuaient la conductibilité des germes. Il semblerait donc que celle-ci est due principalement aux électrolytes provenant du milieu de culture ou diffusés par les cellules microbiennes.

En 1933, Sierakowski et Leczycka [136], mesurant la conductibilité des cultures microbiennes en milieux liquides, ont observé une augmentation de la conductibilité semblant en rapport avec la désagrégation des corps bactériens.

En 1935, Seigneurin signala que la conductibilité électrique des suspensions microbiennes variait avec leur concentration en germes. Il constata, d'autre part, que les courbes de la vitesse de transport et celles de la conductibilité en fonction de la concentration en germes présentent des points caractéristiques communs qu'il nomma « concentration critique ».

Cet exposé des divers travaux concernant l'électrisation des suspensions microbiennes serait incomplet si nous ne mentionnions pas les nombreuses expériences ayant pour objet la différenciation des divers types d'un même germe par leurs propriétés électriques.

Falk, Gussin et Jacobson [51], Falk et Jacobson [52], en 1925, signalèrent le rapport existant entre la virulence des germes et leur potentiel électrophorétique : étudiant diverses variétés de pneumocoques, ils trouvèrent que le type III était le plus chargé en même temps que le plus virulent. De même, ils s'aperçurent que les pneumocoques ayant causé des cas mortels avaient des charges plus élevées que les pneumocoques isolés des cas bénins.

En 1928, Falk et Jensen [53] ont trouvé que, contrairement aux pneumocoques, les bacilles diphtérimorphes aviru-

lents (Hoffman, *cutis communis*) ont un potentiel électrophorétique plus élevé que les bacilles diphtériques virulents. Ils proposèrent même une méthode de diagnostic basée sur les vitesses différentes que prennent les *Corynébactérium* dans le champ électrique. Ces auteurs ont montré d'autre part que les bacilles diphtériques virulents sécrètent une moins grande quantité de toxine quand on augmente leur potentiel électrophorétique et voient leur toxicité augmenter quand on diminue leur charge (par addition de nitrate de La $^{+++}$ par exemple).

En 1929, Chapman [20] constata que les souches de bacilles coli portent des charges caractéristiques, permettant de les classer et de les différencier entre elles. En 1930, Damboviceanu [33], étudiant les colonies R et S des bacilles d'Eberth, de Shiga et d'Aertrycke, nota qu'elles avaient toutes une charge négative, mais que la charge des colonies S est plus petite que celle de R; que, chauffée une heure à 57°, la charge des colonies S augmente, alors que celle de R reste constante; que, dans un milieu isotonique de saccharose pauvre en phosphates, de pH 7, la charge de S est 15 fois plus petite que celle de R. En 1931, Kahn et Schwarzkopf [77] signalèrent des différences de déplacement cataphorétique entre ces colonies R et S du bacille tuberculeux du type bovin et du type aviaire, mais pas avec le type humain; ainsi que des différences de vitesse de déplacement suivant l'âge de la culture. En 1932, R. H. Weaver [154] sépara deux espèces très voisines : *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, en utilisant leurs différences de charge électrique, les *Lactobacillus acidophilus* ayant une charge beaucoup plus petite que les autres. A. C. Brown et J. C. Brown [15], en 1932, étudiant diverses souches de bacilles typhiques, remarquèrent de grandes variations dans la vitesse de transport de ces germes, mais n'observèrent aucune relation entre la virulence des microbes et leur vitesse électrophorétique.

En 1933, Rosenow [129] essaya de déterminer par les dif-

férences de vitesse cataphorétique les diverses espèces de streptocoques. Il constata que la mobilité correspond à une affinité pour un organe déterminé : ainsi les souches neurotropes, bronchotropes, arthrotropes, etc., se distinguent les unes des autres par une vitesse de cataphorèse différente. Il remarqua, de plus, que la vitesse de transport des streptocoques isolés d'une arthrite infectieuse était ralentie par le sérum des malades atteints de cette affection. La même année, Lisbonne et Seigneurin [98], étudiant les *Brucella*, montrèrent que « la vitesse de transport électrique permet de classer ces germes, non pas d'après leurs caractères intrinsèques en *Melitensis* et *Abortus*, comme par les méthodes biochimiques de Huddleson, mais suivant l'espèce animale dont ils proviennent.

Ils distinguèrent ainsi trois groupes de *Brucella* : le groupe ovin, de faible mobilité; les groupes humain et caprin, de moyenne mobilité, et le groupe bovin, de mobilité plus grande.

En 1934, Mlle Choucroun et H. Plotz [26] constatèrent pour les divers types de bacilles tuberculeux : humain, bovin, B.C.G., que la mobilité des souches R est variable suivant l'âge de la culture, tandis que celle des souches S est la même quel que soit l'âge de la culture; que les souches R sont plus mobiles que les souches S. Comme les colonies R sont plus virulentes que les colonies S, ils en conclurent que l'électrisation est d'autant plus importante que la virulence est plus grande (confirmation des travaux de Falk sur la virulence des pneumocoques).

Dorothea Smith et Eléonore Joffre [138], en 1934, conclurent de leurs travaux sur les *Brucella* qu'il était impossible de les classer, d'après leur mobilité, dans des groupes déterminés. De même, E. Soru [139], en 1934, ne put classer les vibrions en vibrions cholériques vrais et en vibrions paracholériques par leur différence de mobilité.

Et pourtant, en 1935, R. Seigneurin a conclu de ses nombreuses expériences que, « dans certaines espèces microbien-

nes, on peut classer et distinguer les divers types ou races par leur mobilité ». Il a signalé également que la mobilité des germes d'une même espèce varie suivant leur virulence et leur pouvoir toxigène, suivant aussi qu'ils forment des colonies R ou S.

Cependant, en 1936, Mlle Choucroun montra qu'on pouvait caractériser une espèce bactérienne en mesurant l'électrisation superficielle de la bactérie.

En effet, à la suite d'expériences sur le bacille tuberculeux et le bacille pyocyanique, Mlle Choucroun a pu conclure « qu'une espèce bactérienne *sauvage* apparaît comme constituée par juxtaposition de populations ayant chacune son hérédité propre; sortes de *lignées pures* à courbe de répartition fixe en ce qui regarde l'électrisation ».

Pour distinguer les diverses variétés pures contenues dans une même espèce microbienne, il suffit donc de mesurer la valeur des électrisations des individus constituant l'émulsion de cette espèce.

Au terme de cette longue série d'auteurs et de travaux relatifs aux propriétés électriques des émulsions microbiennes, on peut se rendre compte que, si l'électrophorèse par exemple a été particulièrement étudiée, la question de l'électrolyse proprement dite a été par contre absolument délaissée.

Cependant, Schiel [132 *bis*], en 1885 et en 1890, Apostoli et Delaquerrière [4] étudièrent l'action du pôle positif sur les microbes et l'action bactéricide du courant galvanique. Ces derniers auteurs concluaient de leurs travaux : « Le courant continu à dose dite médicale (50 à 300 mA.) n'a pas d'action *sui generis* sur les cultures microbiennes dans un milieu homogène, et son unique action polaire positive doit tenir au dégagement des acides et de l'oxygène. »

Mais, à part ces travaux déjà anciens, qui d'ailleurs avaient surtout pour but de déterminer l'action chimique de l'électrolyse, aucune recherche sur l'électrolyse des suspensions microbiennes n'a été entreprise.

Sur la question du pouvoir électrolytique des germes, de leur intensité électrolytique, de leur comportement par rapport au pH des suspensions électrolysées, de leurs propriétés morphologiques et biologiques après électrolyse, on ne trouve aucun travail.

Nos expériences, bien que fort incomplètes, ouvriront donc, nous l'espérons, une nouvelle voie de recherches dans la physique microbienne.

Ce qui peut paraître surprenant, de prime abord, c'est que nous ayons utilisé pour nos expériences d'électrolyse le courant alternatif. En général, une électrolyse se fait en courant continu.

Comme nous l'écrivions dans notre introduction, c'est en étudiant la stérilité des solutions d'hypochlorite alcalin obtenu par électrolyse *en courant alternatif* que nous avons remarqué que l'intensité électrolytique variait selon la teneur en germes de l'eau utilisée et l'espèce microbienne mise en cause. C'est donc cette première constatation qui nous a poussé à continuer nos expériences en courant alternatif.

Mais, de plus, la matière vivante, ici les microbes, ne contient pas seulement des substances salines ionisées, il s'y trouve également d'autres corps peu ou pas conducteurs d'électricité, comme les colloïdes, qui entravent le mouvement des ions. Dans ces milieux hétérogènes inégalement perméables aux ions, le passage du courant entraîne l'accumulation de charges électriques à la limite de séparation des différents milieux, d'où apparition de forces contre-électromotrices de polarisation constituant une véritable polarisation interne. Au contraire, si l'on opère au moyen de courants alternatifs qui changent de sens un très grand nombre de fois par seconde, les phénomènes de polarisation n'ont pas le temps de se produire. On comprend ainsi pourquoi nous avons utilisé le courant alternatif.

CHAPITRE II

L'EAU PURISSIME OU EAU DE CONDUCTIVITE

Pour préparer l'eau purissime, on s'adresse en général à une eau naturelle, convenablement choisie, et on cherche à séparer le corps théorique H_2O des diverses substances qu'elle contient en dissolution ou en suspension (azote, nitrate d'ammoniaque, chlorures, sulfates, matières organiques). Cette séparation s'obtient ordinairement par cristallisation ou par distillation d'eau de source, pauvre en substances minérales. Mais cette séparation n'est jamais parfaite.

Un certain nombre de caractères d'identité définissent l'eau pure.

Le Codex [28] indique les caractères auxquels doit répondre l'eau distillée :

« L'eau distillée ne doit pas modifier la couleur du papier de tournesol sensible. Evaporée à siccité, elle ne doit pas laisser un résidu supérieur à 0,001 %. Additionnée de 2 volumes d'eau de chaux, elle doit rester limpide. Les nitrates d'argent et de baryum, l'oxalate d'ammonium, le bichlorure de mercure, le sulfate d'ammonium, l'iodo-mercurate de potassium en solution alcaline, ne doivent donner ni trouble ni coloration. »

Quant à l'eau bidistillée, obtenue par double distillation, pour répondre aux exigences du Codex, elle ne doit pas donner les réactions du cuivre, du plomb, de l'ammoniaque, des matières organiques, et elle doit avoir un pH compris entre 5 et 6.

Mais, comme l'écrit Rimattei [128] dans son travail sur

l'eau pure, « lorsqu'une eau possède tous ces caractères négatifs, il n'est pas facile de savoir quel est l'ordre de grandeur de la quantité totale d'impuretés qui reste dans le corps qu'on a préparé ». C'est pourquoi, depuis plus de 40 ans, dans les laboratoires de physico-chimie, on remplace ces nombreux essais qualitatifs par un seul essai quantitatif : la mesure de la conductivité de l'eau.

La conductivité γ d'une eau (on dit aussi conductibilité) est l'inverse de sa résistivité ρ, qui est la résistance électrique d'une colonne de ce liquide ayant 1 cm² de section et 1 cm. de longueur. La résistance électrique s'exprime ordinairement en ohms; la résistivité en ohms centimètre-centimètre carré; la conductivité en mho-centimètre-centimètre carré. Au point de vue expérimental, on considère comme une eau rigoureusement pure celle dont la conductivité à 18° égale :

$$\gamma\ 18° = 0{,}04 \times 10^{-6}\ \text{mho-cm-cm}^2.$$

On appelle « eau de conductivité » l'eau pour laquelle

$$\gamma\ 18° = 10^{-6}.$$

C'est l'eau la plus pure qu'on puisse conserver et pratiquement manipuler.

L'eau distillée ordinaire a une conductivité de l'ordre de 10^{-5}, et, pour l'eau de rivière, γ est voisin de 10^{-4}.

Mesure de la conductivité d'une eau. — Quand on veut déterminer la conductivité d'une eau distillée, qui, ainsi qu'on vient de le voir, constitue un électrolyte peu conducteur, on place cette eau dans un vase de verre d'Iéna ou de Pyrex, muni de 2 électrodes identiques en platine pur, disposées parallèlement. On mesure alors la résistance électrique R de la colonne liquide de longueur l et de section s comprises entre les deux électrodes. La conductivité γ cherchée, à la température de l'expérience, est donnée par la formule :

$$R = \frac{1}{\gamma}\ \frac{l}{s}$$

dans laquelle R est exprimé en ohms, l en centimètres, s en centimètres carrés et γ en mhos-cm-cm^2. Le quotient $\frac{l}{s}$ représente la constante de la cuve employée.

Préparation de l'eau pure.

Nous avons vu que deux méthodes sont surtout utilisées pour la préparation de l'eau distillée : la méthode de congélation et celle de distillation. Ces deux méthodes résident essentiellement dans la séparation de l'eau sous un état physique différent permettant de l'extraire des impuretés qu'elle tient en dissolution.

La première méthode met à profit la propriété qu'a un solvant de cristalliser le premier et à l'état pur quand on soumet une de ses solutions à un refroidissement lent. C'est une application des lois de Raoult et de la cryoscopie. On sait, en effet, qu'une telle solution refroidie voit son point de congélation abaissé du fait de la présence des corps chimiques qu'elle contient en dissolution, abaissement qui est en rapport direct avec la nature chimique et physico-chimique de ces derniers. Les premiers cristaux qui apparaissent sont des cristaux du solvant pur : ils se déposeront tels tant que la saturation du solvant ne sera point atteinte par suite de la concentration qui résulte de cette opération.

Cette méthode appliquée à l'eau de source donne des cristaux de glace sensiblement purs et suffisamment débarrassés des sels minéraux pour pouvoir être employée dans les laboratoires. C'est ainsi qu'en 1894 Kohlrausch et Heydweiller [82] sont arrivés à préparer par cette technique une eau de conductibilté égale à $0{,}4 \times 10^{-7}$ inverses d'ohm. Mais un tel produit doit être préparé et conservé à l'abri de l'air (Mylius et Groschuff [111]).

Malgré les excellents résultats donnés par cette méthode, on n'a guère recours à elle en raison des difficultés inhérentes à sa mise en œuvre. En outre, si la cristallisation s'effec-

tue par trop rapidement, des particules de la solution se voient retenues par inclusion entre les différentes plages de clivage cristallin venant souiller ainsi ultérieurement le liquide provenant de la fusion des cristaux.

La deuxième méthode par distillation est de mise en œuvre beaucoup plus aisée; elle donne un bon rendement et un produit de bonne qualité : aussi est-ce la méthode de choix à laquelle on s'adresse couramment.

Cette méthode met à profit la propriété qu'ont les molécules d'eau de prendre l'état gazeux à une température bien inférieure à celle de volatilisation de la plupart des corps qu'elle contient en dissolution. Ces molécules d'eau gazéifiées sont ensuite condensées.

Toutefois, dans cette méthode, trois causes essentielles de souillure sont à signaler :

a) les *projections liquidiennes* entraînées par les soubresauts de liquide en ébullition et auxquelles on remédie assez aisément par un dispositif mécanique convenable;

b) la *nature des récipients* servant à la distillation ou à la conservation du liquide distillé pouvant céder par simple dissolution des ions métalliques acides ou basiques;

c) surtout des *substances gazeuses* que l'eau ordinaire tient normalement et constamment en dissolution et qui voient leur solubilité physique décroître quand la température de la solution augmente (lois de Henry). Ces substances gazeuses peuvent préexister en solution : c'est, dans ce cas surtout, CO_2 qui viendra souiller les premières portions du distillat en augmentant son acidité ionique. Elles peuvent, au contraire, provenir de la décomposition pyrogénée de corps existants spontanément en solution, par exemple : la libération de NH_3 par décomposition des matières organiques, la libération de ClH par hydrolyse de Cl_2Mg dans le cas d'eau magnésienne et de distillation trop poussée. Ces deux derniers corps souillent donc surtout les dernières portions du distillat.

Toutes les méthodes que nous allons indiquer visent, par des moyens divers, à éliminer ces impuretés. C'est pourquoi nous nous sommes permis d'insister sur ces causes.

Dans ce but, en effet, plusieurs moyens peuvent être employés soit isolément, soit simultanément : on prélève uniquement la fraction moyenne du distillat; on détruit les matières organiques par action d'un oxydant énergique — MnO_4K en milieu acide ou alcalin —, suppression de NH_3; on cherche à fixer CO_2 et ClH par un alcali stable — hydroxyde de Ba, de Ca, de K; on élimine l'ammoniaque préexistant ou ayant pu se former soit par des acides, soit par des sels acides fixes. On a donc été amené à multiplier les distillations en opérant chaque fois dans des conditions différentes : généralement, une fois en milieu alcalin (fixation des acides volatils), puis une nouvelle fois en milieu acide (fixation de NH_3), cela avec ou sans action préalable d'un oxydant.

En résumé, les diverses techniques de distillation utilisées peuvent être ramenées à trois types :

1° distillation simple;
2° double distillation;
3° double distillation plus actions chimiques.

1° Distillation unique. — On opère le plus souvent dans un alambic ordinaire ou dans un ballon de verre réuni à un réfrigérant. On part d'eaux aussi peu chargées que possible en substances dissoutes (eaux de rivière).

L'eau distillée ainsi obtenue répond en général aux essais du Codex, mais contient malgré tout, toujours, une quantité assez importante d'impuretés. Pourtant, Muller et Bauer, Oswald [118], obtinrent, par distillation unique, des eaux dont la conductivité à 18° variait entre $1{,}2 \times 10^{-6}$ et 2×10^{-6}. Ils utilisaient des appareils distillatoires dont le serpentin réfrigérant était formé par un métal inattaquable à l'air humide et chargé de CO_2 (argent, cuivre, étain pur sans soudure au plomb). Ils ajoutaient un peu de chaux à l'eau naturelle employée, fixant de ce fait la majeure partie

de CO_2. La distillation était effectuée lentement. Ils rejetaient les premières portions (soit environ 25 %) contenant la majeure partie du CO_2 distillé et de NH_3, libéré de ses sels par la chaux. Ils arrêtaient la distillation quand les 3/4 du liquide restant étaient *passés*. La distillation du dernier quart, où les matières organiques et le chlorure de magnésium se trouvent concentrés, donne un distillat pouvant contenir de l'ammoniaque, provenant de la décomposition de ces matières organiques et de l'acide chlorhydrique provenant de l'hydrolyse de Cl_2 Mg. Bourdillon [30], en 1913, obtint également par une seule distillation une eau encore plus pure ($0{,}1 \times 10^{-6}$). Il opérait dans le vide, en présence de sulfate acide de K sur une masse d'au moins une dizaine de litres d'eau. Il avait soin d'éliminer les têtes et les queues de distillation et d'éviter tout contact avec l'air contenant du gaz carbonique. Signalons enfin que G. Bertrand, dans ses travaux bien classiques, utilisait à cette fin un appareil en argent et obtenait ainsi une eau de très faible conductivité.

2° Double distillation. — Cependant, la difficulté d'obtention d'eau purissime en une simple opération conduisit à purifier l'eau distillée ordinaire par une nouvelle distillation. Il est à remarquer que les alambics à eau bidistillée en verre ordinaire ne donnent pas d'eau de qualité supérieure à l'eau distillée ordinaire. Certains auteurs, comme Girardet et Lasseur, ont montré que des eaux de faible conductivité ($\gamma = 2 \times 10^{-6}$) ayant été bidistillées dans ces appareils, augmentaient de conductivité ($\gamma = 8{,}5 \times 10^{-5}$). Au contraire, un bon verre spécial, comme le Pyrex, n'abandonne qu'une quantité infime de substance et convient tout à fait pour les alambics à eau bidistillée.

3° Double distillation et actions chimiques. — Dès 1863, Bohlig [12], tout en montrant la difficulté d'éliminer complètement l'ammoniaque des eaux, conseillait l'addition d'une certaine proportion de MnO_4K pour obtenir de l'eau

distillée à peu près exempte de matières organiques. En 1867, Stass [140] préparait de l'eau pure en ajoutant au liquide à distiller 4 à 5 % d'une solution concentrée de MnO_4K et, après un jour de repos, un peu de lessive de soude. Il distillait en rejetant le premier vingtième. Il effectuait ensuite une deuxième distillation en présence de sulfate acide de potassium pour retenir les dernières traces d'ammoniaque.

En 1896, G. A. Hulette [75] donnait un procédé de préparation « d'eau de conductivité ». Il additionnait 15 litres d'eau distillée ordinaire de MnO_4K jusqu'à coloration rosée, et laissait reposer deux jours ce mélange.

Il ajoutait alors, au moment de la distillation, 35 cm^3 de SO_4H_2 et il recueillait 2.000 cm^3 de distillat. Ce dernier était redistillé, après addition de 50 cm^3 d'une solution saturée de baryte.

Par ce procédé, Hulette, dans le premier temps, oxydait, grâce au $MnO_4K + SO_4H_2$, les matières organiques pouvant exister dans l'eau distillée ordinaire et, dans le second temps, absorbait CO_2.

En 1897, Harry Jones et Mackay [76] préparèrent de l'eau purissime en remplaçant dans le deuxième temps l'eau de baryte par le mélange : permanganate de potasse, potasse caustique. Il y a ainsi oxydation supplémentaire et absorption d'anhydride carbonique.

Depuis, de très nombreux auteurs : Ostwald et Luther, E. Muller [110], Michaelis [106], etc., ont donné des techniques de préparation d'eau purissime reposant toutes sur le même principe : distillations nombreuses et alternatives sur un mélange acide sulfurique, permanganate de potassium et sur de la baryte. Certains même ont amélioré l'eau ainsi obtenue par barbotage d'un courant d'air exempt de gaz carbonique.

En 1913, A. Tian [146] a heureusement modifié ces procédés en réalisant la double distillation dans le même appareil. Il obtint ainsi une eau très pure ($\gamma = 1{,}1 \times 10^{-6}$ dans l'air et $\gamma' = 0{,}6 \times 10^{-6}$ dans le vide).

Malheureusement, l'appareil utilisé n'est pas très pratique: le réfrigérant, étant en étain ou en argent, doit être relié au reste de l'appareil par des joints spéciaux (coton d'amiante, etc.).

En 1927, Rimattei [128] indiqua un dispositif « capable de fournir rapidement de l'eau de conductivité avec un rendement convenable ».

L'eau distillée ordinaire est traitée pendant deux jours par 0 g. 50 de MnO_4K par litre et additionnée juste avant l'emploi de 5 cm^3 de SO_4H_2 par litre.

Elle est distillée dans un gros ballon en Pyrex muni d'une colonne de Vigreux qui se continue par un tube recourbé amenant le distillat dans un deuxième ballon en Pyrex.

Ce dernier renferme 20 cm^3 d'eau additionnée de 0 g. 50 de MnO_4K et de 0 gr. 50 d'HOK.

Ce liquide est immédiatement redistillé sans nouveau contact avec l'atmosphère (une colonne de Vigreux et un deuxième tube recourbé font communiquer ce deuxième ballon avec un réfrigérant de Liebig, d'où s'écoule l'eau purissime). Par ce procédé, on arrive à distiller 750 cm^3 à l'heure et l'eau ainsi préparée a une conductivité de 1,1 à $1{,}2 \times 10^{-6}$ dans l'air et moins de $0{,}5 \times 10^{-6}$ dans le vide.

Appareil personnel.

Nous avons d'abord utilisé au laboratoire, pour la préparation de l'eau bidistillée, un appareil de Weboba-Pyrex. Cet appareil se compose essentiellement d'un ballon, muni d'un régulateur de niveau (appareil distillatoire) et d'un réfrigérant spécial (la partie supérieure jouant le rôle de réchauffeur-préchauffeur), relié au ballon par un tube coudé (voir figure).

L'eau distillée contenue dans le barillet arrive par un tube de caoutchouc dans le préchauffeur, d'où elle coule goutte à goutte dans le régulateur de niveau et de là dans le ballon à distiller.

Lorsque le niveau convenable est atteint dans ce dernier, l'eau en excès s'écoule par le tube S. Le régulateur de niveau est placé à une hauteur telle que le niveau de l'eau s'étale au diamètre maximum du ballon. La surface de vaporisation est maxima, et l'on obtient ainsi la distillation la plus rationnelle. Le débit au régulateur de niveau est établi de telle

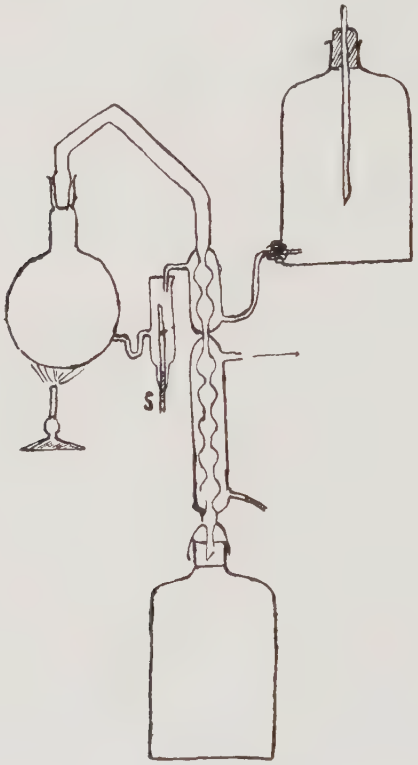


Fig. 1. — Appareil Weboba-Pyrex.

façon que l'eau puisse arriver dans le vaporisateur en léger excès, mais cependant assez lentement pour que la température à laquelle elle arrivera dans le ballon reste aussi élevée que possible. Le régulateur de niveau, qui est ouvert à sa partie supérieure, a l'avantage de permettre aux gaz (CO_2, N, O, etc.) qui sont contenus dans l'eau de se dégager. Il n'en parviendra qu'une faible portion dans le ballon de dis-

tillation et par conséquent ils ne souilleront que peu le distillat.

Nos essais de préparation d'eau purissime avec cet appareil Weboba n'ont pas donné d'excellents résultats. En effet, nous redistillions dans cet appareil une eau distillée qui

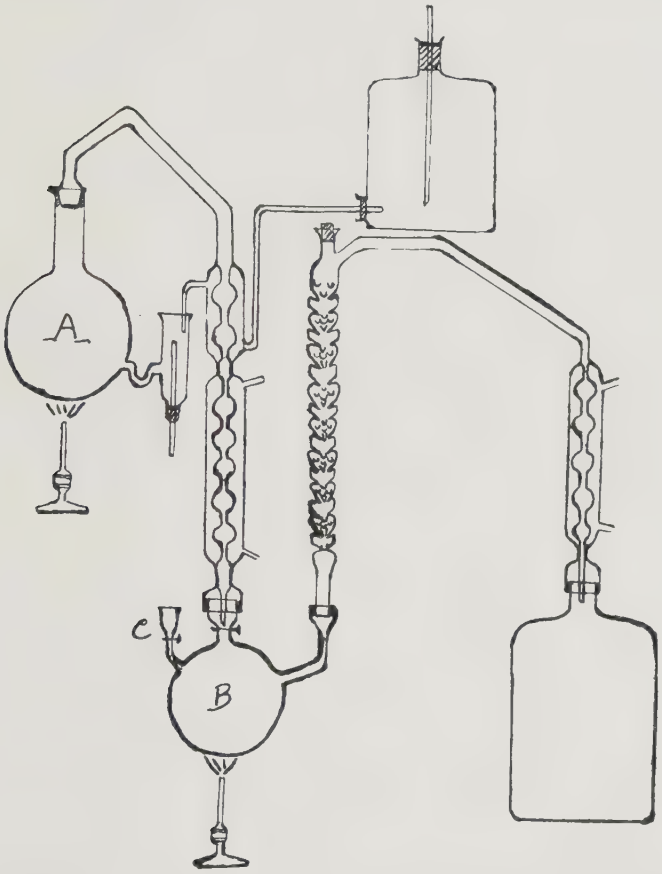


Fig. 2. — Appareil modifié utilisé dans nos expériences.

avait été au préalable traitée pendant 24 heures par du MnO_4K à la dose de 0 g. 50 par litre, puis au moment de l'emploi par 5 cm^3 de SO_4H_2.

Or, le distillat que nous obtenions était absolument négatif à tous les essais chimiques, mais avait un pH relativement

faible : 5,8 à 6,2 (pH des eaux bidistillées ordinaires), et surtout conduisait légèrement le courant. Nous avons pensé que ce fait était dû à des traces de manganèse, entraînées par suite des projections de liquide, dues à une trop forte ébullition, le déphlegmateur n'étant pas assez élevé. En effet, au bout de 4 à 5 jours d'électrolyse de cette eau, on remarquait sur les électrodes et au fond du tube d'électrolyse une poussière jaune que l'analyse nous montra être de l'oxyde de manganèse.

Nous avons, en conséquence, modifié l'appareil Weboba-Pyrex, ainsi que le montre le schéma ci-contre :

Sous le réfrigérant, terminé maintenant par un rodage, nous avons placé un ballon Pyrex de 1 litre à col rodé, muni de deux tubulures latérales : l'une est formée d'un entonnoir à robinet, l'autre est rodée pour recevoir une colonne de Vigreux réunie par un tube coudé à un second réfrigérant. Celui-ci se termine par un capuchon coiffant le flacon récepteur afin que les poussières ou les gaz de l'air ne puissent y pénétrer. Le verre de tous ces accessoires est du Pyrex.

Marche d'une expérience.

On traite pendant 24 heures 10 litres d'eau *récemment* distillée par 0 g. 05 par litre de MnO_4K. On ajoute ensuite 2 cm³ 5 de SO_4H_2 par litre. On homogénéise et on fait arriver petit à petit ce mélange dans le premier ballon. Le liquide passant dans le préchauffeur se débarrasse en grande partie des gaz dissous. Chauffé dans le ballon A, il distille et passe dans le ballon B, où il se mélange à de l'hydroxyde de potassium à la dose de 0 g. 50 par litre, cette solution alcaline étant versée par l'entonnoir à robinet C. Dès que le ballon B est rempli à moitié, on allume son brûleur et on distille de nouveau le liquide ainsi collecté à l'abri de l'air. Les premiers 200 cm³ de ce nouveau distillat sont rejetés ou plutôt utilisés au lavage du récipient qui doit recevoir l'eau purissime. Ensuite, on recueille environ 200 cm³ de cette eau de conductivité.

Nous sommes ainsi arrivé à obtenir 250 à 300 cm^3 de distillat dans l'heure. Nous avons déterminé la pureté de cette eau, non par la mesure de sa résistivité, mais par la mesure de son intensité électrolytique. Nous considérons comme eau purissime toute eau qui, au bout de 48 heures d'électrolyse, n'a pas une intensité électrolytique supérieure à 0 A. 005, les eaux distillées et bidistillées ordinaires ayant dès le départ de l'électrolyse une intensité de 0 A. 05, qui s'élève fréquemment, au bout de 48 heures, à 0 A. 15 - 0 A. 20. Ces eaux purissimes ainsi obtenues ont d'autre part un pH compris entre 6,7 et 6,9.

Manipulation et conservation de l'eau purissime.

L'eau purissime ainsi préparée est reçue et conservée dans des ballons en verre Pyrex nettoyés au préalable de la façon suivante : les récipients bien lavés à l'eau distillée, puis bien égouttés, sont remplis à moitié avec de l'eau de conductivité. Ils sont alors agités vigoureusement et longtemps (au moins 1/4 d'heure), puis vidés et égouttés. On les remplit de nouveau avec de l'eau de conductivité et on les soumet à une nouvelle agitation prolongée. On les vide et on les remplit une dernière fois avec de l'eau de conductivité. Après une dernière agitation, ils sont vidés et prêts à être employés. Si les récipients qu'on utilise sont neufs ou ont contenu diverses substances, il faut alors les laver selon le procédé indiqué par Rimattei :

« Les vases sont remplis avec une solution sulfurique concentrée de MnO_4K. Au bout d'une ou deux journées, on enlève la solution sulfurique, on rince à l'eau distillée ordinaire, puis on traite par de l'eau oxygénée à 10 volumes additionnée d'acide sulfurique, afin d'enlever l'oxyde de manganèse ou le permanganate qui a pu rester adhérent au verre. Le nettoyage final est terminé comme précédemment, c'est-à-dire lavage à l'eau distillée, puis trois lavages successifs par agitation prolongée avec de l'eau de conductivité.

Dans des récipients ainsi nettoyés, l'eau de conductivité se conserve très bien. Il suffit de bien boucher le récipient afin d'éviter l'action de l'air et de le garder à la glacière. En effet, la réaction des ions H^+ sur les ions OH^- étant fortement exothermique, lorsque la température augmente, la dissociation de l'eau augmente et par le fait même sa conductivité (Arrhénius [5]).

Le transvasement, en général, n'altère pas l'eau purissime à la condition de faire couler au préalable sur les parois du récipient qui la contient un peu de liquide qui entraîne les impuretés.

De même, la stérilisation de l'eau purissime à l'autoclave à 120° n'altère pratiquement pas cette eau, si l'on a pris le soin d'utiliser un récipient en Pyrex absolument propre, rempli seulement à moitié, bouché au coton et coiffé de plusieurs épaisseurs de papier imperméable.

CHAPITRE III

DETERMINATION DE LA TENEUR EN GERMES DES EMULSIONS MICROBIENNES

Nombreuses sont les méthodes permettant d'estimer la quantité de germes existant dans une émulsion microbienne. On peut les grouper selon qu'elles sont basées :

1° sur l'évaluation du degré d'opacité due à la présence des germes : méthodes néphélométriques, méthodes opacimétriques;

2° Sur la numération des colonies microbiennes après ensemencement sur milieux nutritifs;

3° sur l'estimation du volume ou du poids de la masse microbienne;

4° sur la numération microscopique des microbes;

5° sur l'activité biochimique des bactéries.

1° Méthodes basées sur la mesure de l'opacité.

Ces méthodes, très utilisées en pratique bactériologique courante pour la titration des vaccins (auto et stock-vaccin), ne donnent qu'une approximation très relative.

En 1902, Boland [14] compara le trouble des cultures microbiennes à un opacité étalon.

En 1918, Dernby et Avery [39] employèrent le néphélomètre de Kober en prenant comme étalon des suspensions titrées de pneumocoques morts.

En 1920, W. Liese [97], utilisant le néphélomètre de Kleinmann, titra des émulsions microbiennes en remplaçant la

suspension microbienne étalon par une suspension stable de glycogène dissous dans l'eau.

En 1921, Fred Vlès [149] fit connaître une méthode opacimétrique rapide du titrage des vaccins reposant sur l'utilisation d'une lumière monochromatique (extrémité rouge du spectre).

Ces méthodes opacimétriques devinrent encore plus précises par l'introduction par Andrejew [3] de l'emploi de la cellule photo-électrique. En 1932, en France, M. Faguet [47 à 50] mit au point ce procédé et l'utilisa même pour déterminer la courbe de croissance des germes.

Ces méthodes ne donnent cependant que des résultats *approximatifs*, car :

a) Elles mesurent indifféremment l'opacité de tous les éléments en suspension, c'est-à-dire des germes eux-mêmes et des particules étrangères d'origines diverses (précipités de *microbes incomplètement lysés*, substances colloïdales ou salines absorbées par ces microbes et provenant de leur métabolisme, etc.).

b) Elles ne tiennent pas compte des variations morphologiques des germes au cours de leur développement (par exemple de la modification de longueur des bactéries), ni des variations de gonflement et de transparence dues aux modifications physico-chimiques du milieu.

2° Méthodes basées sur la numération des colonies microbiennes après ensemencement sur milieux nutritifs.

Ces méthodes, utilisées pour les analyses bactériologiques des eaux, de l'air, du sol, consistent à séparer les germes les uns des autres par un nombre de dilutions tel que tout développement microbien puisse être considéré comme provenant d'un *seul germe vivant*.

C'est Pasteur, en 1860, qui, recherchant le nombre de microbes contenus dans l'air, exposa le premier le principe de cette méthode. En 1879, Miquel [107] perfectionna le pro-

cédé. Ces deux auteurs utilisaient comme milieu d'ensemencement des milieux liquides. C'est Koch, en 1884, qui eut l'idée de mélanger les suspensions microbiennes diluées à des milieux nutritifs capables de se solidifier. Il coulait ces mélanges gélatinés liquéfiés sur des plaques de verre stérile qu'il mettait à l'étuve à 24°.

Il comptait ensuite les colonies à l'œil nu ou à la loupe. Pétri perfectionna la technique en utilisant des cristallisoirs emboîtés les uns dans les autres, cristallisoirs qui portent son nom.

Depuis, de nombreux auteurs étudièrent et perfectionnèrent ces méthodes.

Bonnes pour la pratique courante, ces méthodes sont trop entachées de causes d'erreurs pour être utilisées dans un travail précis. En effet :

a) Si, par définition, un seul germe ensemencé doit donner une colonie microbienne, il arrive fréquemment qu'un amas microbien ne donne, lui aussi, qu'une seule colonie.

b) Seuls, les germes vivants donnent des colonies. Tous les germes morts contenus dans l'émulsion ne peuvent donc être dénombrés par ce procédé.

c) Enfin, si l'on veut faire un dénombrement exact des colonies, il faut que celles-ci ne soient pas trop nombreuses. Pour cela, il faut diluer de nombreuses fois l'émulsion microbienne afin qu'elle soit pauvre en germes. Or, il ne faut pas oublier que le taux d'erreurs croît avec le nombre de dilutions.

3° Méthodes basées sur la mesure du volume ou du poids des masses microbiennes.

Elles consistent à centrifuger à grande vitesse les émulsions microbiennes et à déduire du volume occupé par le culot ou du poids de ce culot le nombre de germes de l'émulsion.

Paine [119] en 1911, Carlson [19] en 1913, Slator [137]

en 1921, déterminèrent la teneur en germes des émulsions microbiennes par la mesure du volume du culot de centrifugation.

En 1933, E. Grundmann [63] perfectionna cette méthode en employant des tubes à centrifuger spécialement calibrés.

En 1935, Erwin Reimesch [126] utilisa des tubes à centrifuger à parois parallèles et estima la hauteur du précipité avec un microscope horizontal muni d'un micromètre oculaire.

La méthode par pesée fut utilisée par Sabouraud [131] pour préparer les vaccins staphylococciques. Il centrifugeait l'émulsion, la décantait, lavait le culot dans du sérum physiologique, centrifugeait une seconde fois et décantait à nouveau et aussi complètement que possible l'eau surnageante. Il pesait ensuite le résidu. Il estime que le « culot » renferme sensiblement 500 millions de coccis par milligramme. F. Vlès [149] utilisa le même procédé, mais pesa le résidu après dessiccation à poids constant à l'étuve à 110°.

Ces méthodes, elles aussi, sont très approximatives. En effet, comme l'a montré E. Grundmann, dans une émulsion microbienne centrifugée pendant 2 heures, à raison de 3.500 tours par minute, il reste encore 20.000 germes par centimètre cube dans le liquide surnageant. D'autre part, les corps microbiens absorbent les sels minéraux du milieu et ils les abandonnent difficilement. Enfin, leur volume et leur poids varient avec leur état d'hydratation.

4° Méthodes basées sur la numération microscopique des germes.

Ces méthodes sont de trois types :

a) Numération directe des microbes après étalement et coloration;

b) Numération à l'aide d'une cellule compte-microbes;

c) Numération comparative.

a) Numération directe des microbes après étalement et coloration.

Le procédé consiste à compter au microscope le nombre total de microbes *colorés* contenus dans une très petite quantité connue de l'émulsion bactérienne.

En 1900, Klein [79] utilisa ce procédé, employant comme appareil de mesure une anse jaugée.

Hehewerth [70] en 1901, Eijkmann [46] en 1904, perfectionnèrent la méthode de Klein.

En 1915, Thoni et Thaysen [147] dénombrèrent des émulsions de bacilles tuberculeux après coloration par la méthode de Burri à l'encre de Chine.

En 1921, Hans Heckscher [69 *bis*], utilisant ces méthodes, remplaça l'anse de platine calibrée par l'emploi d'une pipette compte-gouttes ou à graduations capillaires.

En 1923, Henriques [72] améliora encore la technique en obtenant une répartition plus homogène sur les lames au moment de la dessiccation des suspensions par l'addition d'un « colloïde protecteur » : gomme arabique ou peptone.

b) Numération a l'aide d'une cellule compte-microbes.

Par ce procédé, on détermine microscopiquement le nombre de germes contenus dans une cellule de volume exactement déterminé. Pour que les mesures soient exactes et aisées, ces cellules, à réseau de dimensions connues, doivent être très peu profondes du fait de la sédimentation très lente des bactéries sur le fond gradué. Il se forme en effet plusieurs plans de germes, et il est alors impossible de voir tous les microbes de la suspension. On ne distingue même pas le quadrillage du fond de la cellule.

Les auteurs ayant utilisé ce procédé de numération ont donc, dès le début, donné les caractéristiques des cellules compte-microbes. C'est ainsi qu'en 1914 E. Glynn, M. Powell, A. Rees et G. Lissant Cox [61] recommandaient de teinter les émulsions bactériennes avec une solution faible de thionine

phéniquée et d'utiliser une cellule cinq fois moins profonde que celle des hématimètres ordinaires. En 1916, Liebreich [96] imagina une cellule de profondeur encore plus faible, « une chambre de numération » permettant l'emploi de l'objectif à immersion.

En 1922, Troester [148] indiqua une technique spéciale : afin d'éviter l'erreur due aux différences de teinte des germes colorés, il examinait les microbes sans coloration, mais sur champ obscur, et utilisait une cellule très peu profonde, sans quadrillage. Par contre, il employait un oculaire à filet micrométrique lui permettant de compter toutes les bactéries situées à des niveaux différents, le quadrillage restant toujours visible.

Ce procédé a été utilisé récemment par Wolhfeil [155] en 1933 et Wamoscher [151] en 1937, qui firent des numérations dans le champ obscur à l'aide du condensateur de Peterfi-Zeiss.

Cependant, de nombreux auteurs continuèrent à employer de simples hématimètres. Ch. Hollande et G. Crémieux [74], en 1928, pour la numération du B. K., utilisèrent un hématimètre de Malassez. Salimbeni [132] même, avant d'imaginer son compte-microbes, utilisa un hématimètre ordinaire.

Actuellement, on emploie des hématimètres spéciaux appelés « compte-microbes ». Les plus connus sont ceux de Salimbeni et de Steiner-Reichert.

c) Numération comparative.

C'est Whright [156], en 1902, qui indiqua cette méthode de numération microbienne. On mélange à parties égales l'émulsion microbienne et du sang de richesse globulaire R connue; on étale sur lame, on colore, puis on compte dans plusieurs champs le nombre respectif des microbes M et des globules rouges *r*. Par une simple règle de trois, on obtient le chiffre cherché :

$$x = \frac{M \times R}{r}$$

Cette technique, si simple en apparence, est cependant fort compliquée et sujette à de nombreuses causes d'erreur. En effet, contrairement à ce qu'admettait Whright, le nombre d'hématies par millimètre cube de sang n'est pas constant, et il est nécessaire de titrer le nombre d'hématies chaque fois que l'on veut faire une numération microbienne par ce procédé.

D'autre part, comme l'a fait remarquer Allen [2], le sang coagule très rapidement au cours des diverses manipulations. C'est pourquoi ce dernier auteur conseille de diluer le sang avec une solution de citrate de soude à 1,5 %. L'emploi du sang a d'ailleurs d'autres inconvénients : Leishmann [93] pense que le plasma sanguin lyse un certain nombre de germes; que les agglutinines du sang agissant sur les bactéries faussent les résultats, et surtout qu'un certain nombre de germes mêlés aux plaquettes sanguines ou dissimulées sous les hématies échappent à la numération. Aussi, en 1921, Friès [57] conseilla de remplacer les hématies par des cellules de levure de bière. On évite ainsi d'avoir un mélange inégalement riche, comme c'est le cas avec le mélange sang-émulsion.

Malgré cette amélioration, la méthode comparative, comme l'a montré Dold [40] en 1925, est toujours entachée d'une grande cause d'erreur : la double numération.

3° Méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries.

Peu nombreux sont les auteurs ayant utilisé les propriétés biochimiques des bactéries comme moyen de numération microbienne. Nous devons cependant citer, en France, les travaux de Charles Richet [127] et de ses élèves : Chassevant [21], H. Cardot et E. Bachrach [6], sur les bacilles lactiques et leur développement dans certains milieux et en présence de divers antiseptiques. Ces auteurs déterminèrent la poussée bactérienne en titrant l'acidité fournie. Avant eux, F. Regnard [125], en 1882, évaluait l'activité des levures en

mesurant le gaz carbonique dégagé pendant la fermentation. En Allemagne, H. Luhrig et A. Sartori [102], en 1908, étudiant la fermentation alcoolique, suivaient le développement des levures à l'aide du polarimètre (variation de la déviation polarimétrique provenant de la consommation du glucose). En 1912, Michaelis et Marcora [105], par des mesures de pH, déterminèrent le développement du colibacille. Enfin, récemment, en 1935, en Amérique, J. Howard Mueller [109] détermina la poussée du bacille diphtérique en dosant l'azote contenu dans le culot de centrifugation de la culture microbienne étudiée.

Méthodes de numération microbienne utilisées dans nos expériences (*Travaux personnels*).

Ayant besoin, pour nos expériences, de mesures aussi précises que possible, nous n'avons d'abord retenu de toutes ces méthodes de numération que la méthode du compte-microbes et celle comparative de Whright-Fries.

1° Méthode du compte-microbes.

Nous avons utilisé un compte-microbes de Salimbeni fourni par la maison Jouan et avons opéré de la façon suivante (technique donnée par L. Neipp dans sa thèse de doctorat ès sciences) :

On mélange dans un gros tube à essai 1 cm^3 de l'émulsion microbienne à titrer avec 9 cm^3 d'une solution colorante (solution hydro-alcoolique de fuchsine : fuchsine, 0,10; alcool à 95°, 1 cm^3; eau distillée, 99 cm^3). Après agitation violente de 5 à 10 minutes afin d'avoir un mélange bien homogène, puis repos de 10 à 15 minutes afin d'avoir une bonne coloration de germes, puis nouvelle agitation de 5 minutes, on prélève avec une pipette Pasteur stérile une goutte du mélange que l'on dépose sur la lame de la cellule compte-microbes placée d'avance sur la platine du

microscope. On place alors la lamelle avec précaution pour éviter les bulles d'air et on attend 1/4 d'heure pour que les germes aient le temps de se déposer. On examine alors avec un fort objectif à sec; la numération doit porter sur un minimum de 50 carrés du réseau.

d étant la dilution à laquelle la suspension a été soumise (y compris celle apportée par le colorant); *n* étant le nombre moyen de germes contenus dans un petit carré du réseau, le nombre de germes *x* contenus dans 1 cm³ de la suspension microbienne à titrer est donné par la formule :

$$x = n \times d \times 10.000 \times 1.000.$$

(Le compte-microbes de Salimbeni-Jouan utilisé ayant des carrés de 1/10.000 de millimètre cube).

Pour que cette méthode donne des résultats satisfaisants, il faut :

a) avoir des émulsions suffisamment diluées (si l'émulsion est riche en germes, ne pas hésiter à la diluer à l'aide du colorant au 1/20, au 1/50);

b) agiter assez longtemps le mélange pour que les germes soient suffisamment colorés et surtout *bien* séparés les uns des autres;

c) attendre, avant de faire la numération, que les germes aient eu le temps de sédimenter complètement.

Malgré toutes ces précautions, il est difficile de ne pas avoir des amas microbiens (surtout dans le cas des coccis), des dépôts de colorants, des germes non entièrement sédimentés et, par suite, à des niveaux différents. D'autre part, comme on n'utilise que des objectifs à sec, donc à grossissement relativement faible, certains germes grêles et mobiles passent inaperçus.

Aussi, avec cette méthode, n'avons-nous eu que des résultats « moyens », l'écart entre plusieurs numérations de la même émulsion pouvant être de 50, 100, 200 millions et même quelquefois de milliards de germes.

Voici, à titre d'exemple, quelques résultats obtenus par cette méthode de numération avec diverses émulsions microbiennes.

	NOMBRE de GERMES PAR CM³	ÉCART ENTRE LES NUMÉRATIONS	ERREUR p. 100
Emulsion de coli.....	21.281.000 22.484.000	1.203.000	5,5
Emulsion de pasteurelles.....	900.000.000 600.000.000 864.000.000	36.000.000 300.000.000 264.000.000	40
Emulsion de pyocyanique.....	370.000.000 220.000.000 278.000.000	58.000.000 150.000.000 92.000.000	50

Ces résultats, bien que médiocres, correspondent cependant à ceux obtenus par d'autres auteurs ayant utlisé le procédé des compte-microbes. Les Américains Glynn, Powell, Rees et Cox [61] n'ont eu, en général, que des erreurs de 20 à 22 %. Pour Neipp, la moyenne des erreurs est de 30 à 33 %. Ce dernier auteur fait d'ailleurs remarquer que « l'expérience acquise » joue un rôle très important dans l'utilisation de ces techniques et que si les erreurs sont relativement faibles pour les gros bacilles prenant fortement le colorant, tel le *B. subtilis*, elles deviennent beaucoup plus importantes pour les bacilles plus grêles, donc plus difficiles à distinguer, comme le bacille coli, le bacille pyocyanique, bacilles sur lesquels ont porté nos expériences.

2° Méthode comparative de Whright-Fries.

De nombreux auteurs ayant signalé la difficulté d'emploi de la technique de Whright-Allen, nous avons utilisé directement la méthode de Whright, modifiée par Fries, où les hématies sont remplacées par des cellules de levure.

Nous n'avons cependant pas retenu cette technique, car nous n'avons pu obtenir de bonnes émulsions de levures.

En effet, avec la levure des boulangers, conseillée par Fries, les émulsions obtenues ne contenaient que de rares éléments cellulaires, de dimensions très variées et prenant très mal le colorant. Avec des cultures pures de levures, même après un brassage prolongé à l'agitateur électrique, les levures étaient groupées en amas et ne permettaient pas de faire une numération vraiment satisfaisante. Nous avons donc abandonné ce procédé et avons imaginé de *titrer chimiquement* nos émulsions microbiennes.

En effet, dans nos expériences, ce qui est important ce n'est pas de savoir le nombre « moyen » de germes existant dans 1 cm^3 de l'émulsion (ce qui est suffisant pour la préparation d'un vaccin), mais de connaître aussi exactement que possible la quantité de protéines mises en jeu. L'important, pour nous, est de savoir si les variations observées dans la répétition d'une expérience sont dues à une faible diminution ou augmentation de la teneur microbienne. Or, par les procédés ordinaires de numération, ces faibles différences ne peuvent être exactement connues en regard des erreurs expérimentales.

Nous avons donc choisi comme méthode chimique de titration des émulsions microbiennes la méthode par dosage de l'azote. L'azote est, en effet, l'élément propre à la matière organique des protéines et il est un corps facile à doser. D'autre part, en 1935, Howard Mueller [109] a montré qu'il était possible de mesurer très exactement la poussée microbienne en dosant l'azote contenu dans le culot de centrifugation de la culture étudiée. C'est ainsi qu'il démontra pour des cultures de B. de Lœffler que la quantité d'azote croît environ jusqu'à 40 heures, se maintient ensuite jusqu'à 66 heures, pour redescendre finalement. Reprenant ses expériences sur des cultures de colibacille, nous nous sommes aperçu qu'effectivement la poussée microbienne croissait et se maintenait pendant un certain temps et diminuait ensuite. Nous avons eu ainsi, au bout de 19 heures de culture, une teneur en azote de 8 mg. 9 par litre, de 12 mg. 6 après 67 heu-

res de culture et seulement de 8 mg. 7 après 162 heures de culture. Ces dosages d'azote nous ont permis, d'autre part, de remarquer la grande concordance des résultats entre deux dosages et nous ont ainsi incité à utiliser un tel procédé chimique pour la titration de nos émulsions microbiennes.

Détermination de la teneur en azote des émulsions microbiennes.

C'est Kjeldahl, en 1883, qui, le premier, donna la technique de dosage de l'azote des substances organiques par « voie humide ». Depuis, de nombreux auteurs ont modifié et amélioré sa méthode, mais le principe reste toujours le même : transformation de l'azote des matières organiques en ammoniaque par destruction sulfurique en présence de catalyseurs appropriés. L'ammoniaque, formé en milieu sulfurique, est immédiatement fixé en sulfate d'ammoniaque, qu'il suffit alors de doser. Diverses techniques de dosage ont été proposées à cet effet; elles sont toutes basées sur l'une des trois propriétés analytiques suivantes de l'ammoniaque :

1° L'ammoniaque est oxydé par BrONa avec dégagement de N;

2° NH^3 donne une coloration intense avec le réactif de Nessler;

3° NH^3 est une base volatile.

1° Oxydation de l'ammoniaque par BrONa.

$$3\ BrO + 2\ NH_4 + 2\ HOH \rightarrow 3\ Br + 5\ H_2O + N_2.$$

Cette réaction est surtout utilisée en *macro-analyse*, la quantité d'azote dégagé étant suffisante pour être mesurée volumétriquement.

En *micro-analyse*, il ne peut être question d'une telle mesure. On emploie alors la méthode par reste, consistant à faire réagir un excès connu de solution de BrONa sur la

solution ammoniacale et à titrer en fin d'expérience par iodométrie la quantité de cet oxydant non utilisé.

C'est la technique donnée par Golse [61 *bis*] pour le dosage de faible quantité d'ammoniaque dans les eaux et reprise par Mme Pohorecka-Lelesz [122] :

$$BrO + 2\,I + 2\,H \rightarrow Br + H_2O + I_2.$$

Cette technique est particulièrement indiquée lorsqu'on pratique la kjeldahlisation en présence d'oxalate de potasse (selon la technique classique de Denigès [38]), car on peut faire le dosage directement sur le liquide de destruction.

Par contre, lorsqu'on utilise comme catalyseurs les sels lourds, il faut au préalable libérer l'ammoniaque par distillation, car les sels cuivriques, par exemple, réagissent sur l'iodure de potassium en donnant lieu à un dégagement d'iode :

$$2\,Cu + 4\,I \rightarrow I_2 + 2\,I\,Cu.$$

2° L'ammoniaque donne une coloration intense avec le réactif de Nessler.

Avec le réactif de Nessler (solution sodique d'iodomercurate de potassium), les sels ammoniacaux donnent un précipité brun colloïdal, pour les faibles concentrations, de coloration très intense d'iodure de dimercuriammonium :

$$2\,HgI_4 + 4\,OH + NH_4 \rightarrow 7\,I + 4\,H_2O + NHg_2I\downarrow.$$

Cette réaction, fort anciennement connue, a été appliquée par de nombreux auteurs pour doser colorimétriquement l'ammoniaque.

Certains font une nesslérisation directe sur le résidu de destruction sulfurique, d'autres après distillation préalable. De toute façon, les diverses techniques se résument à traiter simultanément par une quantité déterminée de réactif de Nessler une solution ammoniacale de titre connu et la solution à doser très diluée et sensiblement neutre. Au bout de

5 minutes, on compare les teintes au colorimètre de Dubosc. On fait plusieurs lectures et on prend la moyenne.

L'inconvénient de ces méthodes colorimétriques réside dans le fait, ainsi que le dit Boivin [13], « qu'il ne paraît pas y avoir une proportionnalité absolument rigoureuse entre la teneur en ammoniaque d'une solution et l'intensité de la teinte obtenue.

» D'autre part, selon la façon dont on effectue le mélange du réactif et de la solution d'ammoniaque, on aboutit à des colorations d'intensité un peu variables d'un essai à l'autre (différence dans l'état de dispersion de l'iodure de dimercuriammonium colloïdal); et enfin, comme dans tous les dosages colorimétriques, il y a dans l'appréciation de l'égalité des teintes un facteur personnel et, pour un même observateur, un facteur momentané (fatigue plus ou moins grande de la vue par exemple) qui viennent diminuer la précision des résultats. »

3° L'ammoniaque est une base volatile.

Les méthodes utilisant cette propriété ne se différencient que par des particularités de technique. Le principe en est toujours le même : on déplace NH_3 de sa combinaison saline par une base forte et fixe et on distille. On reçoit le distillat contenant l'ammoniaque dans une solution acide titrée et on dose l'excès d'acide non saturé par l'ammoniaque. Ce dosage se fait soit par acidimétrie (Pregl [124]), soit par iodométrie (Bang [8]).

Techniques utilisées dans nos expériences.

Dans nos premiers essais de dosage de l'azote des émulsions microbiennes, nous avons utilisé la méthode colorimétrique. La technique employée fut celle indiquée par Demenier [37] en 1934; elle consiste à kjeldahliser en présence d'oxalate de potasse et à nessleriser directement sur le liquide de destruction largement étendu d'eau à l'aide d'un

réactif de Nessler-alcali selon la formule de Koch et Mac Meckin :

On dissout 22 g. 50 d'iode dans 20 cm³ d'eau contenant 30 g. IK. Après dissolution complète, on ajoute 30 g. de Hg métallique. On agite jusqu'à ce que le liquide surnageant ait perdu la coloration jaune. On décante le liquide surnageant. On vérifie qu'il possède un léger excès d'iode libre à l'aide d'une solution d'empois d'amidon. On dilue alors à 200 cm³ et on mélange. On ajoute alors 975 cm³ d'une solution d'hydroxyde de sodium pure (D. = 1,33) à 10 % en volumes.

On prépare au moment de l'emploi le réactif de Nessler +alcali en ajoutant à 1 volume de réactif de Nessler, préparé selon les indications précédentes, 2 volumes de la solution d'hydroxyde de sodium pure à 10 %.

Nos expériences portaient la plupart du temps sur trois échantillons semblables, au moins sur deux.

L'écart entre chaque dosage variant de 12 à 15 et même 18 p. 100 nous a fait abandonner la méthode colorimétrique. Nous avons alors utilisé la technique de Pregl, Parnas et Wagner [121], modifiée par Boivin [13], qui nous a donné entière satisfaction. Cette technique, basée sur la volatilité de l'ammoniaque et son entraînement par la vapeur d'eau, a déjà été décrite de nombreuses fois. Nous nous bornerons donc à en donner les détails essentiels et à indiquer les différents tours de main que nous avons utilisés pour en obtenir un excellent rendement.

Méthode de Pregl-Parnas-Wagner-Boivin.

a) Destruction sulfurique.

La question du choix des catalyseurs donnant la meilleure destruction sulfurique a donné lieu à de nombreuses études, parmi lesquelles il faut citer celles de Mestrezat et de

Mlle Janet [104] et celles de Boivin [13]; nous ne les reprendrons pas ici.

Nous avons utilisé comme catalyseur le couple $SO_4Cu + OHg$ en présence de SO_4K_2 indiqué par Boivin, qui donne rapidement une excellente destruction.

Dans un ballon à long col en Pyrex, on met 5 à 10 cm³ d'émulsion microbienne (5 cm³ pour les émulsions riches en germes, 10 cm³ pour les émulsions plus pauvres). On y ajoute 1 cm³ de SO_4H_2 pur + 0 g. 10 de SO_4K_2 + 0 g. 10 de SO_4Cu + 0 g. 10 de OHg.

On chauffe; si la substance ne charbonne pas, on ajoute III à IV gouttes d'alcool à 95°. Le mélange alors brunit. On chauffe jusqu'à décoloration et encore une heure après la décoloration.

On refroidit le matras et on dilue son contenu avec environ 2 à 3 cm³ d'eau distillée. Dans ce même matras, et non dans le ballon distillatoire B de l'appareil de Parnas, comme l'indiquent la plupart des auteurs, on verse alors, dans *l'ordre suivant* :

4 cm³ d'une solution de $S_2O_3Na_2$ à 200 p. 1.000, puis, sur le précipité brun noirâtre, 6 cm³ de lessive de soude pure à 36° Baumé.

Le thiosulfate a pour but de précipiter le mercure sous forme de sulfure de Hg et de libérer ainsi l'ammoniaque du complexe mercuriel sous lequel il se trouve. En effet, si le Hg n'est pas précipité avant la distillation, les pertes d'ammoniaque peuvent aller jusqu'à 15 à 20 p. 100. On est sûr que la précipitation est complète lorsque le précipité a pris une teinte brun noirâtre.

La lessive de soude est ajoutée en excès afin de neutraliser largement le centimètre cube de SO_4H_2 utilisé au cours de la destruction sulfurique et de déplacer facilement l'ammoniaque.

Boivin conseille de déplacer l'ammoniaque « par 10 cm³ d'un *mélange* de 2 volumes de lessive de soude pure à 36° Baumé et d'un volume de solution de $S_2O_3Na_2$ à 200 p. 1.000 ».

Normalement, d'après les travaux de Coleman, Fellows et Dixon [29] et ceux de Davis et Wise [35], la quantité de $S_2O_3Na_2$ indiquée par Boivin, bien que mélangée à la soude, serait suffisante et même en excès pour précipiter tout le mercure.

En effet, d'après ces divers auteurs, pour précipiter 1 g. de Hg, il faut 2 g. de $S_2O_3Na_2$, 5 H_2O si le précipitant est additionné *avant* l'alcali et 2 g. 80 si le précipitant est additionné *avec* l'alcali.

Nous avons cependant remarqué que l'addition *séparée* du $S_2O_3Na_2$ avant la soude nous donnait des résultats plus forts et plus constants.

b) Distillation et dosage de l'ammoniaque.

Après avoir bien agité le liquide de destruction ainsi traité, on le verse par l'entonnoir E dans l'appareil de Parnas. On rince à trois ou quatre reprises le matras où a eu lieu la destruction, avec quelques centimètres cubes d'eau distillée qu'on réunit au liquide de destruction. On fait en sorte que la quantité de liquide final, dans l'appareil de Parnas, remplisse à moitié le ballon distillatoire B (*bien se méfier* de ne pas trop remplir le ballon distillatoire, sinon il peut y avoir de fines projections de liquide, pendant la distillation, dans le tube T, qui sont ensuite entraînées et faussent les résultats).

On ferme l'entonnoir E avec un bouchon de caoutchouc. La pince P étant fermée et la pince *q* ouverte, on porte l'eau du ballon V à l'ébullition.

Par ailleurs, on mesure avec précision 5 cm³ d'une solution d'acide sulfurique N/70 dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 cm³ environ de capacité que l'on place de telle sorte que l'extrémité du réfrigérant T plonge dans la solution titrée d'acide sulfurique.

L'eau du ballon V étant à l'ébullition, on place sous le ballon B une petite flamme pour empêcher la condensation de la vapeur et y maintenir le niveau constant. On ouvre la

pince p et on ferme q. On laisse distiller une quinzaine de centimètres cubes d'eau qui suffisent à entraîner la totalité de l'ammoniaque. On abaisse alors l'Erlenmeyer de façon que la pointe T ne plonge plus dans le liquide, mais touche la paroi, pour éviter les projections de liquide. On laisse encore passer quelques centimètres cubes d'eau pour rincer le tube T, puis on retire la fiole. On porte alors le contenu de celle-ci à l'ébullition afin de chasser complètement CO_2 et on dose la quantité

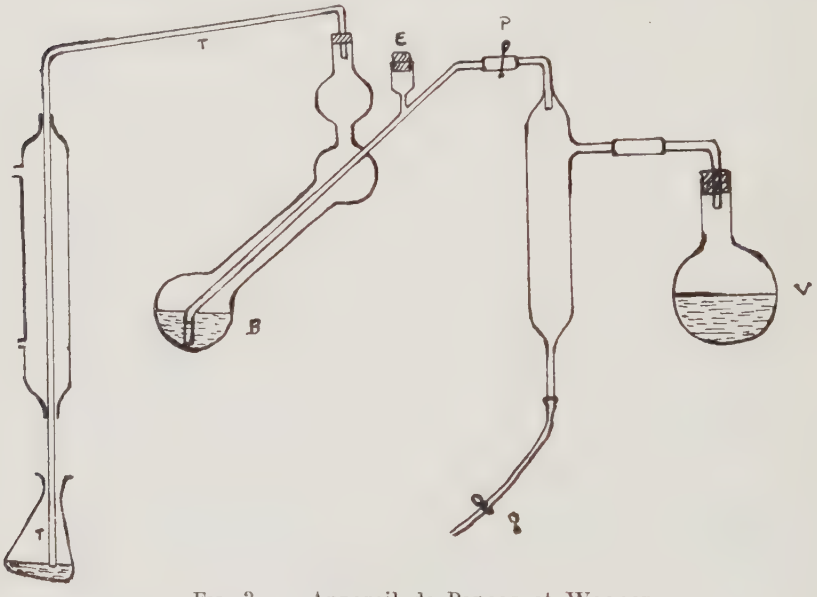


Fig. 3. — Appareil de Parnas et Wagner.

de SO_4H_2 N/70 non combiné à l'ammoniaque à l'aide d'une solution N/70 de HONa en présence de rouge de méthyle comme indicateur.

Le titrage est exécuté au moyen d'une microburette de 2 cm³, graduée en centièmes de centimètre cube.

Avant de titrer, s'assurer que *le distillat n'a pas rendu louche le* SO_4H_2 *N/70* dans lequel on l'a reçu. Il nous est arrivé, en effet, de constater un tel phénomène lorsque la distillation était trop rapide. Le dosage était alors complètement faussé. En suivant à la lettre cette technique et en faisant

avant les dosages un essai à blanc afin de faire la correction due à la très faible alcalinité du Pyrex, nous avons eu des résultats très satisfaisants : les différences, d'ailleurs très faibles, n'étant que de l'ordre du centième de milligramme et même souvent du millième de milligramme.

C'est ainsi qu'avec des émulsions microbiennes de concentration variable, on a obtenu par cette méthode les résultats suivants :

	TITRE EN N de 1 cm³ D'ÉMULSION	ECART ENTRE LES DOSAGES	ERREUR p. 100
Emulsions de pasteurelles :	mg.	mg.	
Emulsion A	1° 0,188 2° 0,177	0,011	6
Emulsion B	1° 0,077 2° 0,074	0,003	4
Emulsion C	1° 0,126 2° 0,128	0,002	1,6
Emulsion D	1° 0,092 2° 0,087	0,005	5,5
Emulsions de gonocoques de l'Institut Pasteur. (Vaccin antigono chauffé titrant 4 milliards de germes par cm³)			
Lot 1	1° 0,270 2° 0,281	0,011	4
Lot 2	1° 0,331 2° 0,337	0,006	1,8
Lot 3	1° 0,358 2° 0,336	0,022	6,3

N. B. — Ces dosages d'azote sur différents lots de vaccins de l'Institut Pasteur permettent de se rendre compte combien Howard Mueller [109] a raison de trouver trop incertaine l'évaluation directe du nombre de microbes et de conseiller pour la préparation des vaccins la méthode de titrage par dosage d'azote. En effet, si les deux derniers lots, qui, au point de vue titre en azote, se rapprochent beau-

coup (0 mg. 33 et 0 mg. 335), correspondent bien à 5 milliards de corps microbiens par centimètre cube, le premier lot ne correspond alors, contrairement à ce qui est indiqué sur la boîte, qu'à 3.151 millions de germes.

Récemment (décembre 1938), Ch. Dumazert [45] a proposé une technique de submicrodosage de l'azote dans la matière organique en réduisant les dimensions de l'appareil de Parnas et Wagner et en le complétant par l'adjonction d'une colonne de Vigreux, en faisant la destruction organique par un volume exact de SO_4H_2 en présence de sélénite de Hg pendant 2 heures et en remplaçant la méthode de titrage acidimétrique par la méthode iodométrique.

Nous n'avons pas utilisé cette nouvelle technique dans nos essais, mais nous pouvons affirmer que la méthode que nous avons employée, *lorsqu'on l'a bien « en main » et qu'on la suit à la lettre*, permet des submicrodosages de l'azote très exacts. D'ailleurs, dans l'étude systématique des catalyseurs de kjeldahlisation qu'ont faite Dangoumeau et Castagnou [34] dans le dosage de l'azote des farines, ces auteurs ont montré que cette méthode au sélénite de Hg donnait d'aussi bons résultats, mais non de meilleurs, que les méthodes classiques, et en particulier que celle que nous avons utilisée.

En effet, nous n'avons jamais été gêné, même à la lumière électrique, pour la fin du dosage acidimétrique, le changement de coloration étant très sensible et très net. D'autre part, le couple catalytique $SO_4Cu + SO_4K_2 + OHg$ nous a toujours donné une destruction sulfurique complète et *rapide;* enfin, la réduction de dimensions de l'appareil de Parnas et Wagner et l'adjonction d'une petite colonne de Vigreux ne nous semble pas indispensable, si l'on ne remplit le ballon distillatoire B *qu'à moitié* et si l'on a soin de distiller **lentement** et suffisamment longtemps (10 à 15 minutes).

Malgré la grande sensibilité de la technique, cette méthode de dosage des émulsions microbiennes, comme le montre le tableau précédent, est entachée d'erreur. Il convient cepen-

dant de remarquer que les erreurs ne dépassent pas 7 %, alors que, par la méthode de numérations au compte-microbes, le taux d'erreurs s'élève parfois jusqu'à 50 %.

Il est d'autre part intéressant de noter que si la méthode de numération au compte-microbes est relativement exacte pour les suspensions microbiennes très peu concentrées (de l'ordre de quelques millions de germes par centimètre cube), l'erreur devient beaucoup plus grande pour des émulsions plus concentrées (centaines de millions ou milliards de germes par centimètre cube), par suite des nombreuses dilutions qu'on doit faire subir à l'émulsion primitive.

La méthode de titration des émulsions microbiennes par dosage d'azote, au contraire, voit son exactitude augmenter avec la concentration, ce qui est normal, car plus la quantité d'azote est grande, moins les erreurs de dosage sont fortes.

CHAPITRE IV

ELECTROLYSE DES EMULSIONS MICROBIENNES EN COURANT ALTERNATIF INDUSTRIEL

1° Appareils utilisés.

L'appareil à électrolyse que nous avons utilisé pour nos expériences se présente ainsi (fig. 4).

Un long tube de verre Pyrex de 15 cm. de longueur et de 2 cm. de diamètre est fermé par un bouchon en verre, rodé, creux, portant deux longues électrodes de platine. Ces deux électrodes sont larges de 1 millimètre et sont écartées de 3 millimètres l'une de l'autre grâce à trois bagues de verre. Leur extrémité distale atteint à 1/2 cm. du fond du tube. Le bouchon de verre portant les électrodes possède à son extrémité supérieure un petit orifice bouché au coton pour permettre aux gaz de se dégager. Ce tube à électrolyse porte à sa partie supérieure un trait de jauge correspondant à 35 cm^3 afin que le volume de l'électrolyte soit constant dans les différentes expériences.

Pendant l'électrolyse, il plonge dans un second tube parcouru par un courant d'eau à température constante, jouant le rôle de réfrigérant afin d'empêcher toute élévation de température de l'électrolyte par suite de l'effet Joule.

Cet appareil *est entièrement stérilisable*. Après chaque expérience, les électrodes sont bien décapées au savon minéral, plusieurs fois lavées à l'eau distillée ordinaire ainsi que le tube, puis cinq ou six fois à l'eau purissime; après égouttage et séchage à l'air, l'appareil est enveloppé de papier et stérilisé à l'autoclave 20 minutes à 120°.

Cet appareil à électrolyse a été utilisé sur courant alternatif industriel de 120-130 volts. Pour cela, les électrodes étaient reliées par un fil à une prise de contact du laboratoire.

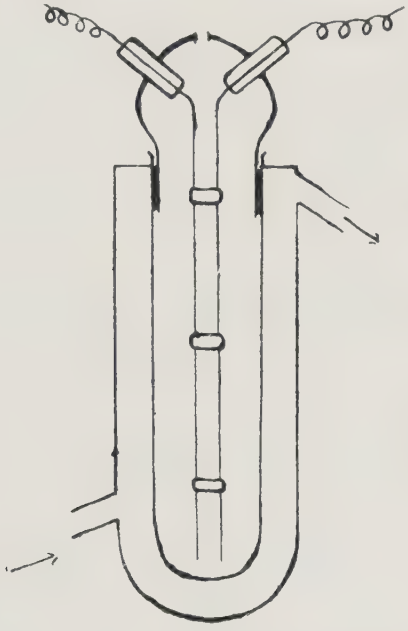


Fig. 4. — Appareil à électrolyse utilisé pour nos expériences.

Le galvanomètre destiné à la mesure de l'intensité électrolytique, placé dans le circuit, est un petit milliampèremètre Chauvin-Arnoux, appelé « contrôleur universel ».

2° Protocole des expériences.

Le germe à étudier est cultivé 18 heures à l'étuve à 37° dans du bouillon viande-foie (on cultive généralement une dizaine de tubes). Après cette opération, les cultures sont versées dans de gros tubes à centrifuger stériles et centrifugées 20 minutes à grande vitesse. On rejette le liquide surnageant et on délaie le culot dans de l'eau distillée stérile. On centrifuge de nouveau 20 minutes à grande vitesse.

On rejette de nouveau le liquide surnageant. On effectue à nouveau un lavage identique.

Finalement, le culot obtenu est dilué dans de l'eau purissime stérile et transvasé dans un tube à centrifuger stérile, préalablement nettoyé à l'eau purissime. On centrifuge 20 minutes. On rejette le liquide surnageant; on délaie dans l'eau purissime et on recentrifuge 20 minutes. Ce *nouveau* culot est enfin délayé dans de l'eau purissime, et l'émulsion obtenue est celle qu'on utilise pour l'expérience.

Ces nombreuses centrifugations ont pour but de débarrasser entièrement les germes de toute impureté exogène. Nous avons constaté que ce nombre de centrifugations était nécessaire pour que le dernier liquide surnageant ne donne aucune réaction avec les réactifs chimiques usuels : NO_3Ag et Cl_2Ba.

L'émulsion microbienne ainsi obtenue est utilisée de la façon suivante : 35 cm^3 sont placés dans l'appareil à électrolyser; 5 ou 10 cm^3 sont employés pour le dosage de l'azote; le reste est gardé à la glacière pour des *essais ultérieurs*.

L'appareil à électrolyse, ainsi rempli jusqu'au trait de jauge par l'émulsion microbienne, est plongé dans le réfrigérant.

On envoie le courant et on note l'intensité électrolytique de départ. On consigne ensuite toutes les demi-heures, puis toutes les heures, les variations de l'intensité.

Parfois, au bout de quelques heures, le plus souvent au bout de plusieurs jours, le milieu se clarifie : les électrodes se recouvrent de germes agglutinés; d'autres agglutinats microbiens tombent au fond du tube. A partir de ce moment, on doit vérifier fréquemment la valeur de l'intensité électrique afin de noter le moment exact où la clarification est totale et où l'intensité ne croît plus. Ce palier d'intensité constante est de plus ou moins longue durée suivant le germe. Puis, l'intensité électrolytique grandit de nouveau et augmente en flèche : à partir de ce moment, les germes agglutinés sur les électrodes noircissent, « se minéralisent »,

et la température du milieu s'élève malgré une réfrigération importante. Pendant la période d'intensité constante et de clarification totale, nous avons prélevé stérilement, à la pipette Pasteur, quelques centimètres cubes du liquide afin de déterminer son pH à l'aide du pehemètre de Hellige (méthode colorimétrique).

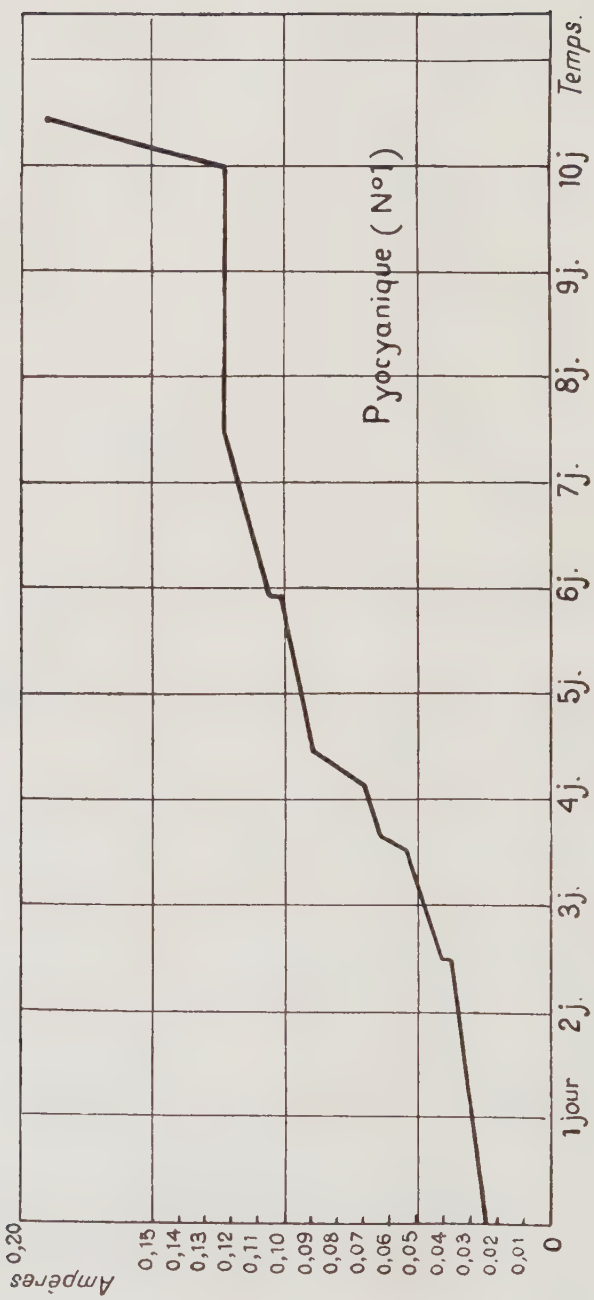
Nous avons également ensemencé le liquide clair, les germes agglutinés sur les électrodes et les germes agglutinés tombés au fond du vase, afin de constater s'ils sont capables de cultiver et s'ils ont été transformés par l'électrolyse.

Compte rendu de nos expériences.

Expérience n° 1.

Cette expérience, ainsi que la suivante, n'a pas été effectuée avec l'appareil à électrolyse décrit ni avec une émulsion microbienne titrée, notre méthode de dosage n'étant pas encore mise au point. Nous les mentionnons cependant, car elles nous ont permis de résoudre la question du voltage pour nos expériences postérieures. Notons, en outre, que les courbes obtenues ici sont, comme on pourra le constater, identiques à celles obtenues avec notre technique définitive. En effet, en même temps que nous inscrivions l'intensité électrolytique, nous notions le voltage du courant. Nous avons pu ainsi remarquer que si les petites variations de voltage au cours d'une électrolyse donnaient aux courbes un peu moins de régularité, elles ne leur changeaient pas leur allure générale et surtout n'occasionnaient pas de changement au point de vue floculation.

Cette expérience a été faite avec une émulsion de B. pyocyanique Labo Y, de concentration *moyenne* dans de l'eau bidistillée stérile. Au bout de 7 jours 1/2 d'électrolyse, nous avons observé la clarification du milieu et obtenu un « palier » à 0 A. 122. Ce palier dure deux jours, puis l'intensité électrolytique part en flèche (voir figure).


Pyocyanique (N°1)
Ampères
0,20
0,15
0,14
0,13
0,12
0,11
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
1jour
2j.
3j.
4j.
5j.
6j.
7j.
8j.
9j.
10j
Temps.

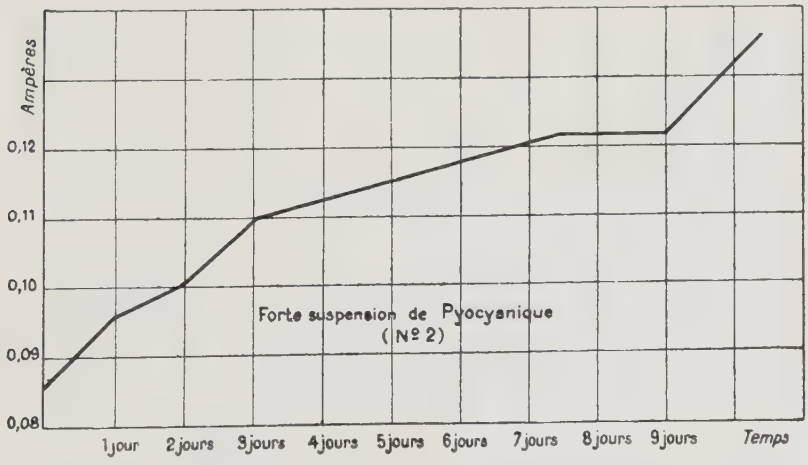
Les voltages du courant aux différents moments de l'établissement de la courbe étaient les suivants :

121,5 — 121,5 — 122 — 121,5 — 121,5 — 121,5 — 121,5 — 122,5 — 121 — 121,5 — 121 — 121 — 121 — 120,5 — 121 — 122 — 121 — 121,5 — 120,5 — 120,5 — 121,5 — 121,5 — 122,5 — 122,5 — 123 — 124 — 124 — 122,5 — 122,5 — 123 — 121,5 — 121 — 122 —122 — 123,5 — 123,5 — 123,5 — 123,5 — 124 — 124 — 125,5 — 127 — 123,5 — 122,5 — 124 — 124 — 124 — 124,5 — 125 — 127 — 125,5 — 127 — 119 — 119 — 120 — 119,5 — 121,5 — 121,5 — 121 — 124 — 126,5 — 123 — 123.

Après l'életrolyse, l'émulsion ensemencée sur gélose a donné de superbes colonies grasses, confluentes et *très fortement pigmentées.*

Expérience n° 2.

Cette expérience, comme la précédente, n'a pas été faite selon la technique définitive. Mais, comme la précédente, elle est intéressante par la courbe obtenue et l'inscription des différents voltages.



L'émulsion de concentration microbienne élevée a été obtenue à partir de cultures sur gélose d'un B. pyocyanique

Labo X non pigmenté et ne se repigmentant pas par repiquage. Au bout de 7 jours et 20 heures d'électrolyse, la clarification du milieu fut obtenue pour un palier de 0 A. 122 qui dura 30 heures (voir figure).

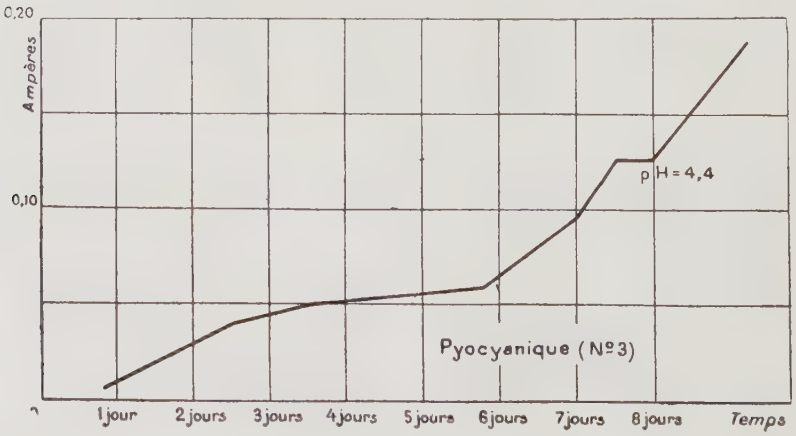
Les voltages durant l'électrolyse furent les suivants :

121,5 —122 — 122 — 123,5 — 124,5 — 124 — 124 — 124 — 124, — 124 — 125, — 124,5 — 124,5 — 125 — 125,5 — 126,5 — 126,5 — 121 — 121 — 121 — 121 — 121 — 121,5 — 120,5 — 121,5 — 122, — 122,5 — 122,5 — 122,5 — 122,5 — 123 — 124,5 — 124,5 — 125 — 122 — 122,5 — 121,5 — 122 — 121,5 — 123 — 122,5 — 121,5 — 122,5 — 122,5 — 122 — 122,5 — 123 — 123,5 — 123 — 124 — 123,5.

Après l'électrolyse, les germes agglutinés, ensemencés sur gélose, ont donné de superbes colonies grasses, confluentes et *très fortement pigmentée.*

Expérience n° 3.

Cette expérience, ainsi que toutes les suivantes, a été effectuée selon la technique définitive et avec l'appareil à électrolyse décrit au début de ce chapitre. Elle a été effectuée sur une émulsion en eau purissime et stérile de B. pyocyanique Nègre, cultivé 18 heures en bouillon viande-foie.



Le titre en azote de l'émulsion fut de 0 mg. 044 par centimètre cube. L'intensité de départ de l'électrolyse fut de 0 A. 0075.

Au bout de 65 heures 1/2 d'électrolyse, on observa un début de clarification. Mais cette dernière ne fut totale et le palier ne fut obtenu qu'au bout de 7 jours 1/2, à 0 A. 125 (voir figure).

Le pH du liquide clair était de 4,4.

Le liquide clair ensemencé ne poussa pas.

Le culot de germes agglutinés, ensemencé sur gélose et en bouillon, a donné des cultures incolores qui, repiquées sur pomme de terre, ont donné des colonies *beaucoup plus fortement pigmentées* que la souche primitive repiquée sur le même milieu.

N. B. — Il est à remarquer que le palier d'intensité est un peu plus élevé pour cette émulsion que pour les émulsions précédentes (à 0 A. 125 au lieu de 0 A. 122). Il ne doit falloir attribuer cette légère variation qu'aux conditions d'expérience différentes.

Expérience n° 4.

Cette expérience a été effectuée sur une émulsion de très forte concentration, en eau purissime *stérile, du B. pyocyanique Nègre* cultivé 18 heures à 37° en bouillon viande-foie.

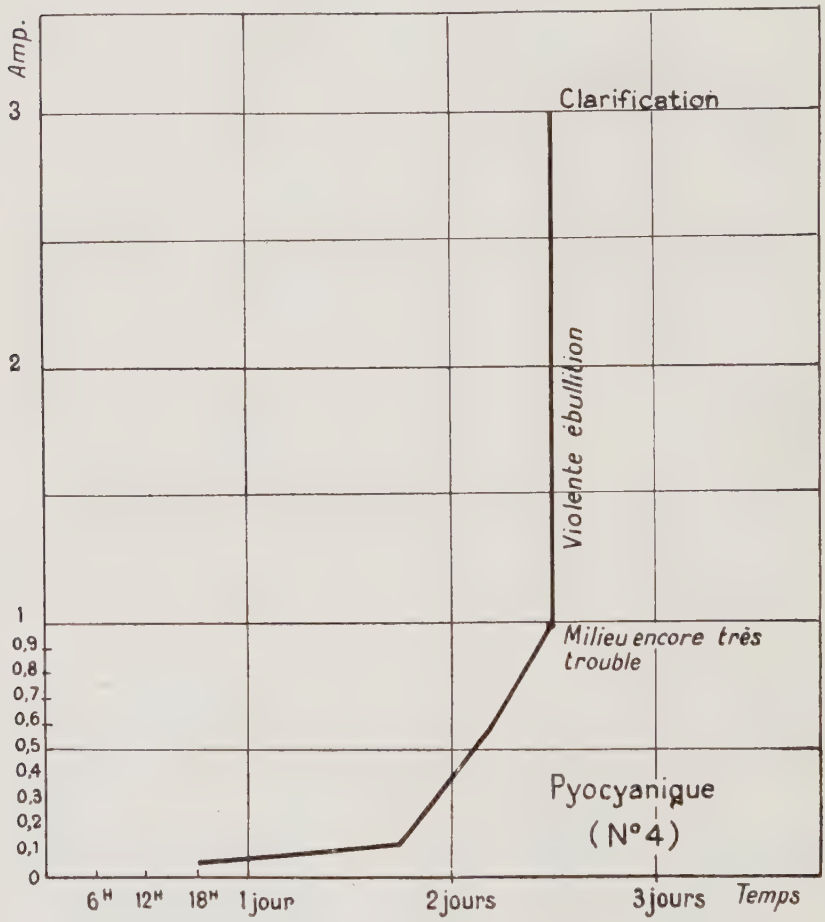
Le titre en azote de l'émulsion était de 0 mg. 28 par centimètre cube. L'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 029.

Au bout de 24 heures, l'élévation de l'intensité électrolytique : 0 A. 155, est normale. Le milieu est toujours aussi trouble.

Après 40 heures d'électrolyse, on observa une augmentation très sensible de l'intensité électrolytique (1 A. 06) et un échauffement notable du milieu malgré la réfrigération extérieure constante.

Cet échauffement augmente d'ailleurs de minute en minute ainsi que l'intensité électrolytique. L'émulsion entre même

en ébullition et, au bout de 41 heures 1/4 d'électrolyse, le milieu se clarifie entièrement. Mais aucun « palier » ne se produit : l'intensité croît toujours en flèche.

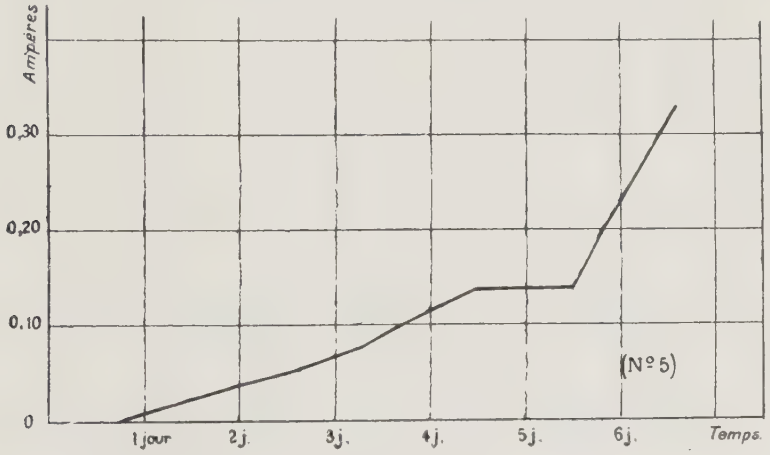


Le pH du liquide clair = 3,6.

Le liquide clair et les bactéries agglutinées, ensemencées, n'ont pas poussé.

Expérience n° 5.

Elle a été effectuée sur une émulsion en eau purissime d'une culture de 18 heures à 37° d'un bouillon viande-foie de germes coccobacillaires, Gram négatif, indologènes, faisant fermenter le glucose, ne faisant fermenter ni la lactose, ni la dulcite, ne réduisant pas le rouge neutre, ne poussant pas sur pomme de terre, n'ayant aucune action sur le lait simple et tournesolé et présentant les caractères des *pasteurelles*.



Le titre en azote de l'émulsion était de 0 mg. 075 par centimètre cube. L'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 0015.

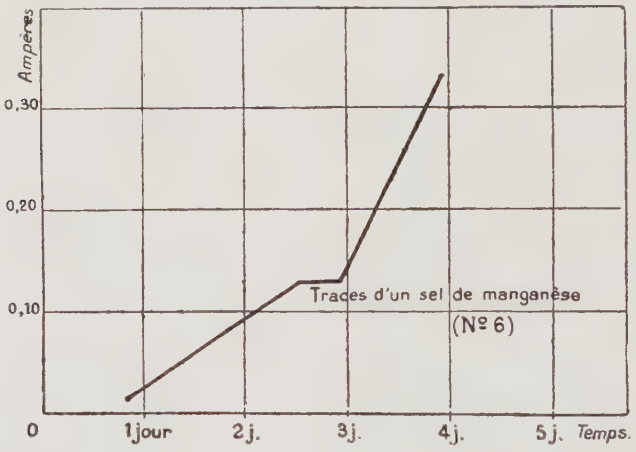
Au bout de 3 jours et 16 heures, on observe un éclaircissement total du milieu avec un « palier » d'intensité à 0 A. 137 et qui dure 24 heures. Ensuite, les germes agglutinés sur les électrodes noircissent et l'intensité remonte en flèche (voir figure).

Expérience n° 6.

Cette expérience a été faite sur une émulsion en eau purissime stérile d'une culture de 18 heures à 37° en bouillon viande-foie du même germe coccobacillaire utilisé à l'expérience précédente.

Le titre en azote de l'émulsion était de 0 mg. 128 par centimètre cube, l'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 01.

Après 19 heures d'électrolyse, on observe un début d'agglutination sur les électrodes et un léger dépôt jaunâtre (sans doute dû à des traces de manganèse). L'agglutination devient totale et le liquide absolument clair au bout de 40 h. 30' d'électrolyse. Le « palier » est à 0 A. 130 : il y demeure 10 heures de suite. Puis les agglutinations noircissent sur les électrodes et l'intensité croît en flèche.



Le culot de microbes agglutinés et le produit de raclage des électrodes, ensemencés, poussent. Seul, le liquide clair ne pousse pas.

L'abaissement du « palier » par rapport à celui obtenu dans l'expérience précédente nous a paru imputable à la présence dans l'eau purissime utilisée de traces de manganèse (?).

Expérience n° 7.

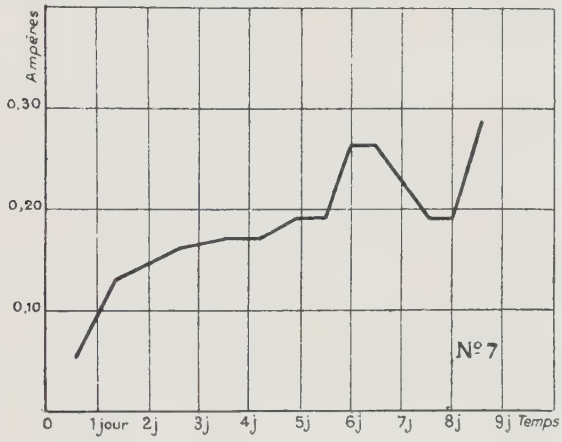
Nous mentionnons cette expérience, car elle a été effectuée avec le même germe que les deux expériences précédentes. Mais l'émulsion fut faite dans de l'eau purissime *non stérile* et l'électrolyse dans l'appareil *non stérilisé*.

L'émulsion a été pratiquée avec une culture de 18 heures à 37° en bouillon viande-foie.

Le titre en azote de l'émulsion était de 0 mg. 190 par centimètre cube, l'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 057.

Les germes commencent à agglutiner après 69 heures à 0 A. 165.

Au bout de 4 jours et 18 heures d'électrolyse, l'éclaircissement du milieu est très net (0 A. 215), mais il ne devient vraiment total que 24 heures après, à 0 A. 265. A ce moment,



au lieu d'avoir le palier habituel d'intensité, on constate que cette dernière diminue progressivement jusqu'à 0 A. 220, puis qu'elle se remet à croître en flèche, les germes agglutinés sur les électrodes se mettant à noircir (voir figure).

Le liquide clair ensemencé ne pousse pas, les germes agglutinés poussent, mais ne donnent pas de culture pure. Au lieu de ne retrouver que des coccobacilles Gram négatif, on trouve en outre des bâtonnets Gram positif, présentant la morphologie du *B. subtilis* et des coccis en amas, Gram positif présentant la morphologie du staphylocoque.

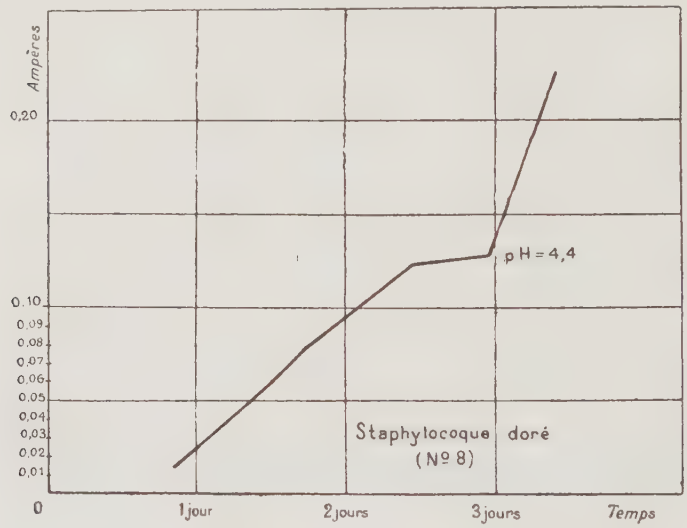
On peut donc penser que ce sont ces différents germes présents dans l'émulsion qui ont donné à la courbe électrolytique son allure si spéciale.

Expérience n° 8.

Elle a été effectuée sur une émulsion en eau purissime stérile d'une souche de staphylocoque doré dite Phil, obtenue à partir d'une culture en bouillon viande-foie de 18 heures à 37°.

Son titre en azote était de 0 m. 07 par centimètre cube, l'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 015.

Après quarante heures d'électrolyse, on obtient une clarification totale avec palier à 0 A. 125 durant 8 heures (voir figure).



Le liquide clair a un pH = 4,4.

Les germes agglutinés tombés au fond du tube sont ensemencés. Ils poussent et donnent des colonies *beaucoup plus fortement pigmentées* que la souche non électrolysée.

Le liquide clair ensemencé ne pousse pas.

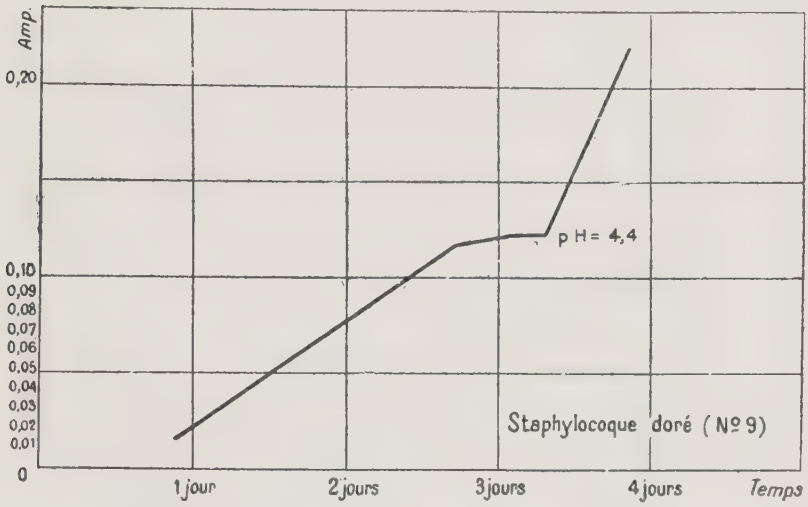
Expérience n° 9.

Cette expérience a été faite sur une émulsion en eau purissime stérile d'une souche de *staphylocoque doré* dite Labo, obtenue à partir de cultures en bouillon viande-foie de 18 heures à 37°.

Titre en azote : 0 mg. 11 par centimètre cube.

Début de l'électrolyse : 0 A. 015.

Au bout de 41 heures d'électrolyse, on observe un début de clarification du milieu par dépôt de germes agglutinés sur les électrodes. On obtient un « palier » à 0 A. 125 après 63 heures d'électrolyse (fig. 9).



pH du liquide clair = 4,4.

Les germes agglutinés sur les électrodes, ensemencés, n'ont donné d'abord que des cultures grêles; mais, repiqués, ils ont donné de superbes colonies *beaucoup plus fortement pigmentées* que celles obtenues à partir de la souche non électrolysée.

Les germes agglutinés, tombés au fond du tube, et ensemencés, ont donné dès la première opération *des colonies très fortement pigmentées*.

Expérience n° 10.

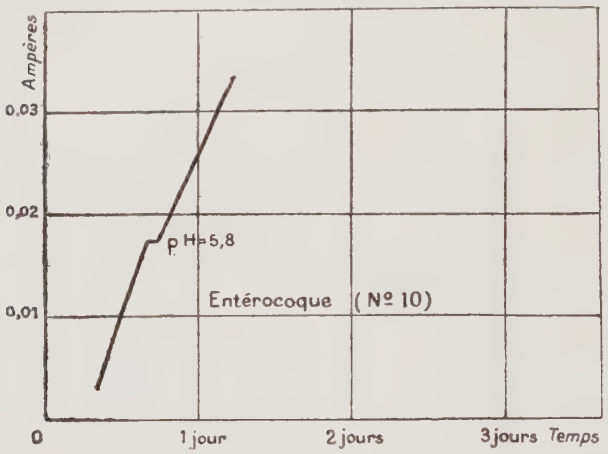
Elle a été effectuée sur une émulsion en eau stérile (contenant des traces de manganèse) d'une souche d'entérocoque

dite Labo, obtenue à partir de culture en bouillon viande-foie de 18 heures à 37°.

Le titre en azote était de 0 mg. 075 par centimètre cube, l'intensité de départ de l'électrolyse de 0 A. 012.

Après 6 heures d'électrolyse, on observe une clarification totale du milieu avec « palier » à 0 A. 0175 pendant 2 heures (voir fig. 10).

Le pH du liquide clair était de 5,8.



Le liquide clair, ensemencé, n'a pas poussé. Les germes agglutinés sur les électrodes et ceux tombés au fond du tube ont poussé et ont gardé leur propriété de faire fermenter l'esculine.

Expérience n° 11.

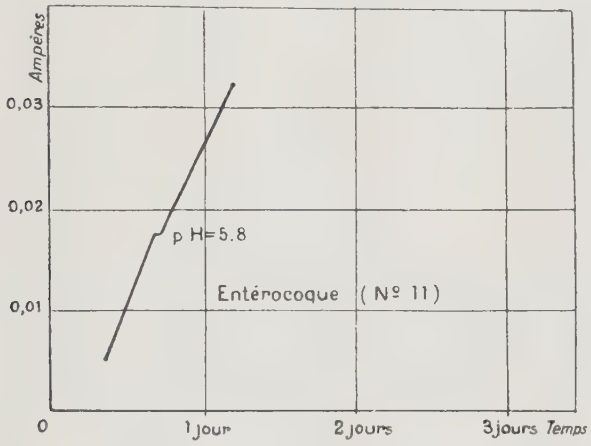
L'expérience a été faite sur une émulsion en eau purissime stérile (ne contenant aucune trace de métaux) du même entérocoque (Labo). Ce germe avait cultivé 18 heures à 37° en bouillon viande-foie.

Titre en azote : 0 mg. 13 par centimètre cube.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 012.

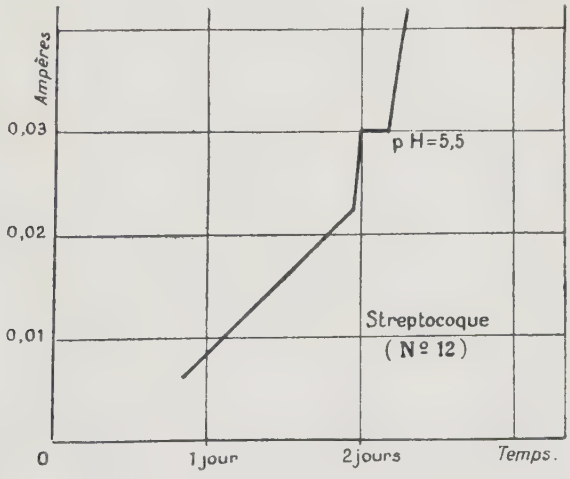
Après 5 heures d'électrolyse, on observe une clarification

totale du milieu avec « palier » à 0 A. 0175 durant 1 heure (voir fig. 11). Les germes agglutinés sur les électrodes et ceux tombés au fond du tube, ensemencés, ont poussé.



Expérience n° 12.

L'expérience a été faite sur une émulsion en eau stérile, contenant des traces de manganèse, de cultures d'une sou-



che de streptocoques (Dr Moureau). Ceux-ci avaient cultivé 24 heures à 37° en bouillon viande-foie.

Titre en azote : 0 mg. 04 par centimètre cube.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 016.

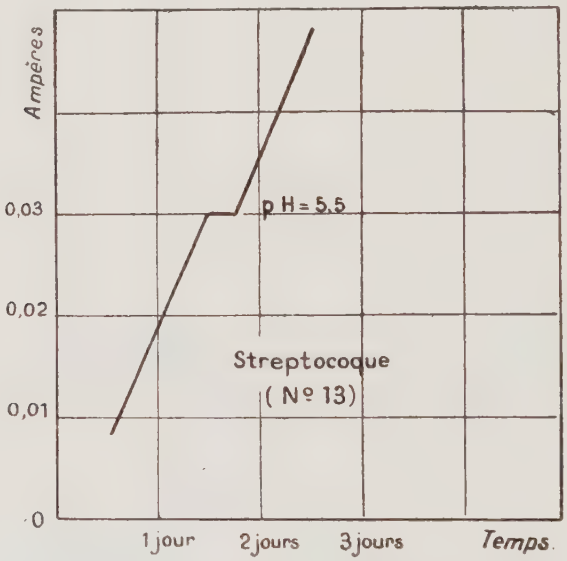
La clarification totale du milieu se produisit après 24 heures d'électrolyse et on observa un « palier » à 0 A. 03 pendant 6 heures (voir fig. 12).

Le pH du liquide clair était de 5,5.

Les germes agglutinés sur les électrodes ou tombés au fond du tube, ainsi que le liquide clair, ensemencés, n'ont pas poussé.

Expérience n° 13.

Effectuée sur une émulsion en eau purissime stérile de cultures de 24 heures à 37° en bouillon viande-foie d'une souche de streptocoques (Labo).



Titre en azote : 0 mg. 118 par centimètre cube.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 013.

On observe une clarification totale du milieu après 4 heures d'électrolyse et un « palier » de 3 heures se produit à 0 A. 030.

pH du liquide clair = 5,5.

N. B. — Sur la même émulsion non électrolysée, une nouvelle électrolyse nous a donné exactement la même courbe et le même palier, le pH du liquide clair étant toujours égal à 5,5 (voir fig. 13).

Les germes agglutinés, ensemencés, n'ont pas poussé.

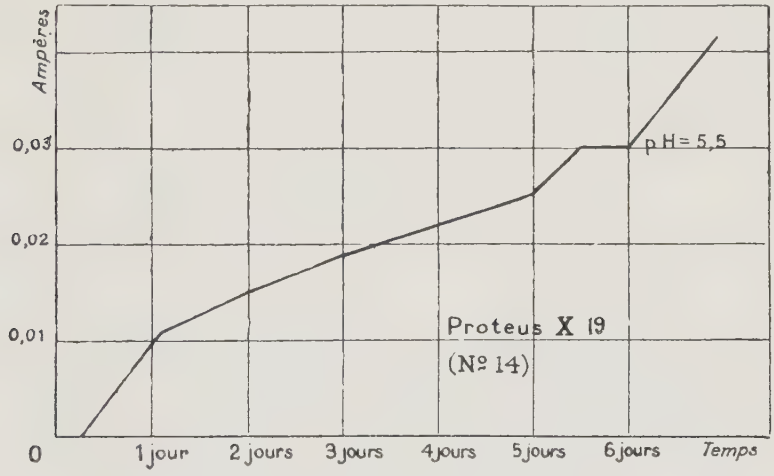
Expérience n° 14.

L'expérience a été faite sur une émulsion en eau purissime stérile d'une culture de 18 heures à 37° d'un bouillon viande-foie de B. protéus X 19 (souche du Dr Moureau).

Cette souche de protéus X 19 est une souche de protéus immobile, non cilié, poussant en colonies séparées et non en nappe. C'est un protéus X 19 type O.

Titre en azote : 0 mg. 0217 par centimètre cube.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 008.



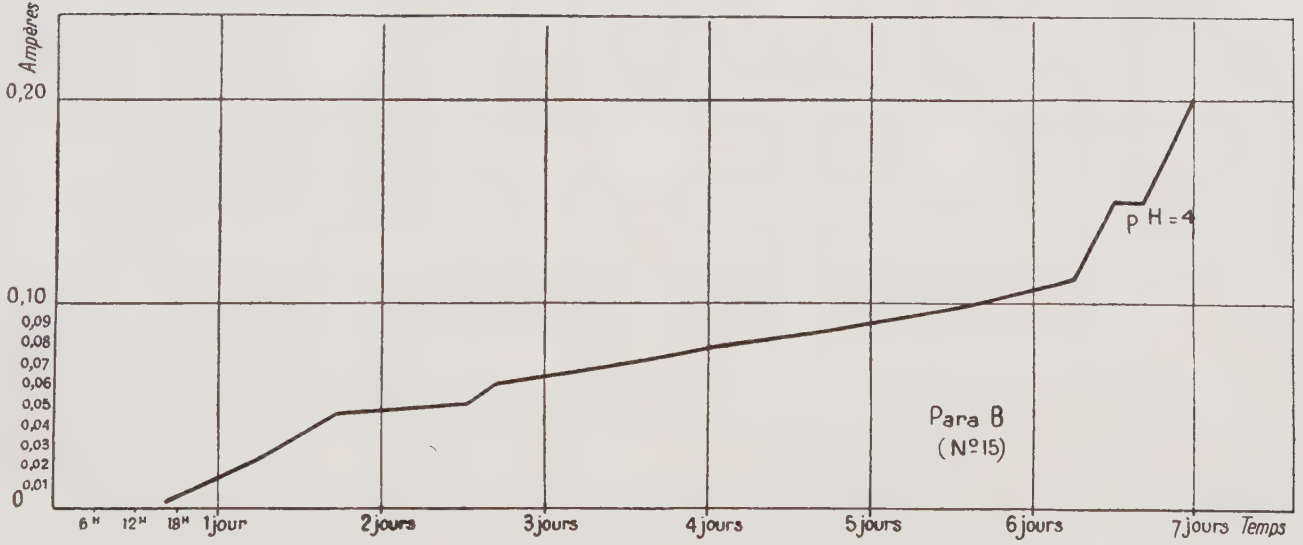
On observe une clarification totale au bout de 5 jours et un « palier » de 8 heures se produit à 0 A. 030 (voir fig. 14).

Le pH du liquide clair = 5,5.

Ensemencés, les germes agglutinés ont poussé.

Expérience n° 15.

Effectuée sur une émulsion en eau purissime stérile d'une culture de 18 heures à 37° en bouillon viande-foie d'un B.


Ampères
0,20
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
6H
12H
18H
1 jour
2 jours
3 jours
4 jours
5 jours
6 jours
7 jours
Temps
pH = 4
Para 8
(N°15)

paratyphique B (souche du Dr Moureau). Emulsion non titrée, mais de concentration moyenne.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 0125.

Au bout de 6 jours d'électrolyse, on observe la clarification totale du milieu et un « palier » à 0 A. 150.

pH du liquide clair = 4.

Ensemencés, les germes agglutinés ont poussé.

Expérience n° 16.

Nous mentionnons cette expérience, très incomplète, seulement pour montrer une fois de plus que les microbes pigmentés, après électrolyse, voient leur pigmentation très fortement augmentée.

Une culture de 53 jours sur milieu de Loewenstein à 37° d'un bacille paratuberculeux fléole est émulsionnée en eau purissime.

Comme les bacilles sont agglutinés entre eux et donnent une émulsion très instable, on les brasse dans un flacon stérile rempli de billes de verre pendant 1/2 heure à l'agitateur électrique de Leune. On laisse déposer plusieurs heures et on utilise pour l'électrolyse l'émulsion stable surnageant.

Départ de l'électrolyse : 0 A. 006.

Après 16 heures d'électrolyse, on obtient la clarification totale du milieu.

pH du liquide clair = 6,05.

Nous n'avons pu établir la courbe et la durée du palier, car nous avons été interrompu dans notre expérience par la mobilisation. Un camarade a cependant bien voulu marquer l'heure de la clarification totale, prendre le pH du liquide clair et ensemencer les germes agglutinés.

Ainsi, nous pouvons mentionner que les germes électrolysés ont poussé plus rapidement que la souche primitive : départ de la culture en 4 jours. D'autre part, ils ont donné sur pomme de terre des colonies *orangé foncé*, alors que la souche non électrolysée a donné des colonies *orangé clair*.

Voir sur les pages suivantes les tableaux résumant nos diverses expériences.

Caractéristiques des germes électrolysés.

MICROBES MIS EN EXPÉRIENCE		CULTURE	PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES	PIGMENTATION	INVARIABILITÉ dans LA PRISE des COLORANTS
B. Pyocyanique Labo Y.	P*	+	+	++++	+
	G*	+	+	++++	+
	L*	—			
B. Pyocyanique Labo X.	P	+	+	++++	+
	G	+	+	++++	+
	L	—			
B. Pyocyanique Nègre	P	+	+	++++	+
	G	+	+	++++	+
	L	—			
B. Pyocyanique Nègre	P	—			
	G	—			
	L	—			
Pasteurelles Labo	P	+	+		+
	G	—			
	L	—			
Pasteurelles Labo	P	+	+		+
	G	+	+		+
	L	—			
Staphylo doré Phil.	P	+	+	++++	+
	G	+	+	++++	+
	L	—			
Staphylo doré Labo	P	+	+	++++	+
	G	+—	+	++++	+
	L	—			
Entérocoque Labo	P	+	+		+
	G	+	+		+
	L	—			
Entérocoque Labo	P	+	+		+
	G	+	+		+
	L	—			
Streptocoque (Dr Moureau)	P	—			+
	G	-			+
	L	—			+
Streptocoque Labo	P	—			+
	G	—			+
	L	—			+
B. Protéus X19 (Dr Moureau)	P	+	+		+
	G	+	+		+
	L	—			
B. Paratyphique B (Dr Moureau)	P	+	+		+
	G	+	+		+
	L				
B. Paratuberculeux Fléole	P	++		++++	+
	G	++		++++	+
	L	—			

* P = Précipité. — G = Germes agglutinés sur les électrodes. — L = Liquide clair.

MICROBES MIS EN EXPÉRIENCE	PURETÉ DE L'EAU (exprimée en ampères)	TITRE DE L'ÉMULSION (en azote)	INTENSITÉ ÉLECTROLYTIQUE (au départ de l'expérience)	CARACTÉRISTIQUE DE L'ÉLECTROLYSE			pH DU LIQUIDE CLAIR
				APPARITION DU PALIER	DURÉE	INTENSITÉ	
	A.	Mg.	A.	Heures	Heures	A.	
B. Pyocyanique Labo Y..			0,025	180	48	0,122	
B. Pyocyanique Labo X..			0,086	188	30	0,122	
B. Pyocyanique Nègre ..	0,005	0,044	0,0075	180	12	0,125	4,4
B. Pyocyanique Nègre ..	0,005	0,28	0,029	Absence de « palier ».			
Pasteurelles Labo	0,001	0,075	0,0015	88	24	0,137	
Pasteurelles Labo	0,0025 (Traces de Mn)	0,128	0,01	40,30	10	0,130	
Staphylocoque doré Phil.	0,005	0,07	0,015	40	8	0,125	4,4
Staphylocoque doré Labo.	0,005	0,11	0,015	63	6	0,125	4,4
Entérocoque Labo	0,005 (Traces de Mn)	0,075	0,012	6	2	0,0175	5,8
Entérocoque Labo	0,005	0,13	0,012	3	1	0,0175	5,8
Streptocoque (Dr Moureau).....	0,004 (Traces de Mn)	0,04	0,016	24	6	0,03	5,5
Streptocoque Labo	0,005	0,118	0,013	4	3	0,03	5,5
B. Protéus X 19 (Dr Moureau).....	0,005	0,021	0,008	120	8	0,03	5,5
B. Paratyphique B (Dr Moureau)	0,005		0,0125	144	5	0,15	4
B. Paratuberculeux Fléole.....	0,005		0,006	16			6,05

CHAPITRE V

ANALYSE CRITIQUE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Les diverses expériences que nous venons de rapporter nous amènent à constater les faits essentiels suivants :

I. — *L'électrolyse en courant alternatif industriel des émulsions microbiennes en eau purissime donne une courbe d'intensité électrolytique spécifique pour chaque germe* (Voir l'ensemble des courbes ci-contre).

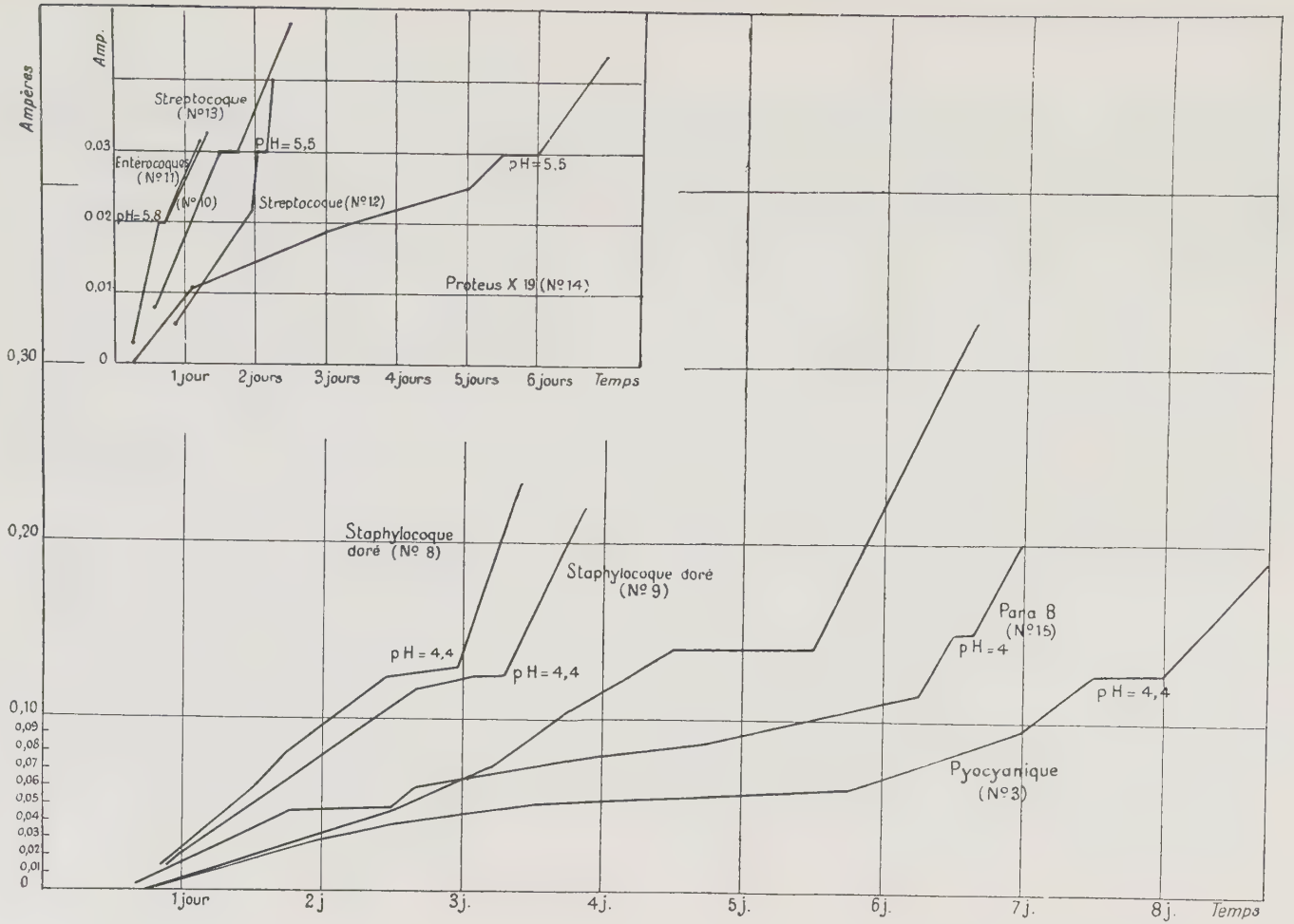
Chaque courbe se divise essentiellement en trois parties : deux lignes ascendantes à inclinaison variable, séparées par une ligne horizontale que nous appellerons *palier d'intensité*. L'inclinaison des deux lignes ascendantes varie pour un même germe d'une expérience à l'autre : elle semble liée à plusieurs facteurs, dont un nous paraît surtout important, c'est la teneur en germes.

Mais l'élément caractéristique de ces courbes réside dans la valeur du palier d'intensité. Ce palier est spécifique pour chaque type de germe et sa valeur paraît correspondre à celle du point iso-électrique du germe étudié.

Les caractères essentiels de ce palier sont les suivants :

a) Il se traduit organoleptiquement au cours de l'expérience par une clarification totale et parfaite du milieu. A ce moment, le pH du liquide présente toujours une même valeur pour un même germe (Voir tableaux récapitulatifs).

Il est à remarquer que les pHi obtenus par cette méthode correspondent en général à ceux obtenus par cataphorèse. Pfeiffer [120], par la méthode de cataphorèse, attribue en effet aux bacilles Gram + un pHi voisin de 5, aux bacilles Gram — un pHi de 2 à 3, au bacille paratyphique B un pHi = 4.


Ampères
Amp.
Streptocoque (N°13)
pH = 5,5
Entérocoques (N°11)
(N°10)
pH = 5,8
Streptocoque (N°12)
pH = 5,5
Proteus X 19 (N°14)
0,03
0,02
0,01
0
1 jour
2 jours
3 jours
4 jours
5 jours
6 jours
Temps
0,30
0,20
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
Staphylocoque doré (N° 8)
pH = 4,4
Staphylocoque doré (N° 9)
pH = 4,4
Para B (N°15)
pH = 4
pH = 4,4
Pyocyanique (N°3)
1 jour
2 j
3 j.
4 j.
5 j.
6 j.
7 j.
8 j.
Temps

b) La rapidité de son obtention semble être liée à la proximité de la neutralité du pHi des germes (exception faite pour le protéus X 19) et en outre pour un même germe à la concentration de l'émulsion : plus le titre en est élevé, plus grande est la rapidité d'obtention du palier (staphylocoque doré excepté).

c) La durée paraît être inversement proportionnelle à la concentration microbienne de l'émulsion mise en expérience. (Voir les tableaux récapitulatifs.) Cependant, de faibles différences dans la teneur en germes des émulsions microbiennes ne changent pas l'allure générale de la courbe. Par contre, de fortes concentrations microbiennes empêchent la formation du palier, et la courbe électrolytique n'a plus rien de caractéristique. C'est ce qui s'est produit dans notre expérience n° 4.

Il convient de remarquer que les petites différences de voltage durant l'électrolyse ne changent pas l'allure générale des courbes (Voir expériences n^{os} 1 et 2).

C'est pourquoi nous n'avons pas introduit ce facteur dans l'élaboration de nos courbes.

La pureté de l'eau utilisée joue au contraire un rôle important. En effet, si la présence de traces d'un métal comme le manganèse dans l'eau purissime n'influence pas la courbe électrolytique d'un germe lorsque l'obtention du point de floculation est rapidement atteint (expériences n^{os} 10 et 12), par contre, lorsque l'électrolyse est lente, c'est-à-dire dure plusieurs jours par exemple, ces traces de métaux abaissent le point de floculation des germes (expérience n° 6). Cela confirme les travaux de Pierre Girard [59] : les ions métalliques abaissent et annulent la vitesse de déplacement des germes, ce qui se traduit par une diminution de stabilité, puis par une floculation de la suspension.

Il est donc absolument nécessaire d'utiliser une eau purissime. Cette eau doit, d'autre part, être stérile et être utilisée dans un appareil stérile si on veut obtenir des courbes spécifiques. En effet, lorsque l'électrolyse d'un germe dure plu-

sieurs jours en milieu non stérile, des souillures se développent et leur présence empêche l'obtention d'un palier constant et toujours le même (expérience n° 7).

II. — *En courant alternatif industriel de* 120-130 *volts, l'électrolyse n'a pas d'action destructrice sur les corps microbiens* (Voir tableaux récapitulatifs).

Il faut en excepter les deux souches de streptocoque étudiées. Au contraire, la vitalité des germes semble accrue : c'est ainsi que le pyocyanique, le para-B, le protéus X 19, l'entérocoque, électrolysés, ont donné des cultures en quelques heures, que le paratuberculeux fléole électrolysé a donné des colonies visibles à l'œil nu dès le 4e jour. A ce sujet, nous devons faire remarquer que nous n'avons jamais observé de différences, soit dans la vitalité, soit dans les propriétés biologiques, soit dans les affinités tinctoriales, soit dans le pouvoir chromogène, entre les germes électrolysés agglutinés sur les électrodes et les germes électrolysés agglutinés tombés au fond du tube.

III. — *Nous avons pu observer d'une façon constante l'augmentation du pouvoir chromogène des germes pigmentés sous l'influence de l'électrolyse en courant alternatif.*

Le phénomène est extrêmement net. Il ne semble pas y avoir d'exception à cette règle.

Afin d'être sûr que la cause de cette augmentation de pigmentation était bien l'électrolyse, nous avons utilisé le même milieu pour cultiver l'émulsion primitive et les germes électrolysés. Nous nous sommes, pour cela, adressé à la pomme de terre : la même pomme de terre était coupée en quatre morceaux, lavés et trempés durant quelques heures dans une solution bicarbonatée, mis en tube et stérilisés. Deux de ces tubes étaient ensemencés avec les germes non électrolysés, les deux autres avec les germes électrolysés.

La variation de la pigmentation ne pouvait donc être attribuée à une différence de milieu de culture.

A quoi peut-on donc attribuer cette accentuation du pouvoir chromogène ? On sait que les facteurs qui influent le plus sur la production des pigments microbiens sont, en dehors de la constitution chimique du milieu, la présence d'oxygène, la réaction du milieu et la vitalité du germe. La puissance chromogène diminue quand la vitalité s'atténue, soit spontanément, soit sous l'influence d'antiseptiques. (L'augmentation de pigmentation après l'électrolyse prouve donc bien que ce phénomène n'a pas en général d'action destructrice sur les microbes, mais que, au contraire, elle leur donne une plus grande vitalité [exception faite pour le streptocoque, qui est détruit].)

La réaction du milieu ne peut être invoquée ici, car, dans nos expériences, ce milieu, légèrement alcalin, fut le même pour les germes électrolysés et non électrolysés par suite de l'emploi de la même pomme de terre. Par contre, la réaction des germes ensemencés a varié. En effet, les germes non électrolysés ont leur charge électrique habituelle et normale alors que les germes électrolysés étaient, au moment de leur ensemencement, à leur point isoélectrique.

Ne serait-ce pas à cette neutralité électrique qu'il conviendrait d'attribuer la puissance chromogène ?

Une autre interprétation de l'augmentation de la pigmentation pourrait être invoquée à l'image de celle que proposa Neipp [113], en 1937, à propos de ses expériences d'ordre chimique.

Etudiant l'influence de certains sels tels que le nitrate de lanthane à diverses concentrations sur la pigmentation du bacille pyocyanique, il a constaté que ce ne sont pas les concentrations en sel provoquant une forte multiplication microbienne qui donnent la pigmentation la plus intense ou la plus rapide, mais plutôt les concentrations peu exaltantes. Neipp émet alors cette hypothèse : « Cela ne serait-il pas le reflet d'une manifestation de défense, préliminaire d'une accoutumance vis-à-vis de certains sels métalliques, employés à des doses peu favorables mais non mortelles ? »

Ne pourrions-nous pas émettre nous-même cette hypothèse de « reflet d'une manifestation de défense » vis-à-vis d'un courant électrique ?

Cependant, si l'électrolyse provoque une augmentation de pigmentation, on rend la pigmentation à des germes normalement pigmentés, elle ne donne pas la pigmentation aux germes qui d'habitude n'en possèdent pas.

IV. — Nous avons pensé qu'il serait intéressant de savoir si les souches S et R donnent les mêmes courbes électrolytiques. Pour ce qui est du protéus X 19, nous avons pu constater que l'électrolyse ne semble pas transformer le type O en type H.

Nous devons, en outre, signaler une constatation faite au sujet des émulsions microbiennes : en eau *bidistillée ordinaire*, stérile, elles ont, avec le pyocyanique par exemple, un pH égal, aussitôt après leur préparation, à celui de l'eau utilisée : 6,1-6,2. Au bout de quelques jours, par contre, le pH de l'émulsion s'élève à 6,6-6,8. Cette constatation confirme les travaux de Seigneurin, qui concluait : « Les suspensions aqueuses des germes négatifs sont plus alcalines que l'eau qui a servi à les préparer. » Il ajoutait : « les suspensions de germes positifs sont plus acides », mais nous ne pouvons confirmer cette dernière conclusion, car nous n'avons pas mesuré le pH des émulsions de para-B par exemple.

V. — Enfin, il convient de remarquer que l'électrolyse en courant alternatif des émulsions microbiennes n'a aucune répercussion sur les affinités tinctoriales des germes. Tous les germes Gram + avant l'électrolyse le sont encore après et fixent aussi fortement le colorant. De même, tous les germes Gram — restent négatifs. En 1933, Burke et Gibson [16], renversant le signe de la charge des bactéries, ne purent inverser la réaction de Gram : ils démontraient ainsi qu'il n'y a pas de relation entre la réaction de Gram et la charge électrique. Nos expériences sur un plan voisin confirment donc leurs conclusions.

*
* *

Les travaux que nous rapportons ici peuvent paraître incomplets. Nous-même pensions étudier un plus grand nombre de germes. Nous en avons été empêché par la mobilisation et la guerre.

D'autre part, il peut paraître surprenant que nous nous soyons tant étendu sur la question des numérations microbiennes et sur la meilleure méthode de titration des émulsions. Nos travaux ont été aussi complets que possible à ce sujet, car nous pensions que la quantité de germes en expérience jouait un rôle capital dans l'obtention des courbes électrolytiques. Les expériences nous ont montré, au contraire, que, seule, une grande différence de concentration microbienne faisait varier ces résultats.

Si, pour le travail présent, cette étude de la titration des émulsions microbiennes ne joue pas un rôle de premier plan, nous pensons cependant que nos travaux à ce sujet n'auront pas été inutiles, car la méthode de titration des émulsions microbiennes par dosage de l'azote que nous avons imaginée et mise au point pourra rendre service par suite de sa grande exactitude.

Quant à l'eau purissime, nous ne sommes arrivé à son obtention parfaite qu'après de nombreuses heures de travail. Nous avons dû perfectionner l'appareil de Weboba, qui, à l'usage, ne nous donnait pas les résultats espérés. La recherche et la mise au point d'une technique parfaite pour obtenir une eau absolument purissime étaient indispensables pour mener à bien nos expériences, car nous avons vu que la présence infime d'un sel diminue la stabilité des suspensions et amène plus rapidement leur floculation.

Enfin, dans nos expériences, nous avons été gêné par le manque d'appareil enregistreur. Pour obtenir des courbes exactes, nous devions nous tenir constamment au laboratoire et surveiller de quart d'heure en quart d'heure la marche de l'électrolyse. Lorsqu'il s'agissait de germes flocu-

lant rapidement, nous n'étions pas particulièrement gêné; par contre, pour les opérations durant plusieurs jours, il suffisait que le palier d'intensité se produisît pendant la nuit pour que nous soyons obligé de recommencer tout notre travail. Il nous paraît donc nécessaire de conseiller à qui voudrait continuer ces travaux d'utiliser un milliampèremètre enregistreur. Ainsi, le début et la fin du palier sont notés exactement et on peut refaire sur la même émulsion une seconde expérience, dans laquelle on détermine d'une façon précise le pH du liquide clair, et cela sans difficulté, car on sait exactement le moment de la clarification totale grâce à la première courbe donnée par l'appareil enregistreur.

CONCLUSIONS

Pour les besoins de nos expériences, nous avons été amené à mettre au point :

1° *Un procédé de préparation de l'eau purissime.*

Il consiste à traiter chimiquement une eau récemment distillée et à lui faire subir une double distillation, à l'abri de l'air, dans un appareil en verre Pyrex spécialement conçu et réalisé pour nos expériences.

2° *Une méthode aussi exacte que possible de titration des émulsions microbiennes.*

La méthode par *microdosage de l'azote* que nous préconisons nous a donné d'excellents résultats.

Quant à l'étude proprement dite de l'électrolyse, des émulsions microbiennes en courant alternatif industriel, il en résulte les notions essentielles suivantes :

A. — *Cette électrolyse permet de déterminer le pHi des germes et d'obtenir une courbe d'électrolyse spécifique de chaque microbe, courbe dont l'élément caractéristique consiste dans un « palier d'intensité » correspondant précisément au pHi.*

B. — *Cette électrolyse ne stérilise pas les suspensions microbiennes à quelques exceptions près, mais au contraire accroît en général la vitalité des germes.*

C. — *Cette électrolyse accentue le pouvoir chromogène des germes pigmentés sans toutefois donner une pigmentation à ceux qui en sont naturellement dépourvus.*

Vu : *Le Doyen,*
PIERRE MAURIAC.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
E. AUBERTIN.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 5 février 1941.
Le Recteur de l'Académie,
G. BOUSSAGOL.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abbott. — Galvanotropism of bacteria. *Science*, XXVII, p. 910, 1908.
2. Allen. — The attenuation of bacteria due to temperature shock. *Journ. of Bact.*, VIII, p. 535, 1923.
3. Andrejew. — Eine neue Methode zur Untersuchung der Kolloïden Systeme. *Kolloïd Zeit.*, XXXXIII, p. 14, 1917.
4. Apostoli et Delaquerrière. — De l'action polaire positive du courant galvanique constant sur les microbes, et en particulier sur la bactérie charbonneuse. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CX, p. 918, 1890.
5. Arrhenius. — *Zeit. Physik Chemie*, XI, p. 827 1893.
6. Bachrach. — Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. Thèse doct. ès sc., Paris, 1924.
7. Bancroft. — *Journ. of Exp. Zoology*, IV, p. 157, 1907.
8. Bang. — Uber die Mikrobestimmung des Reststickstoffs. *Bioch. Zeit.*, LXXXVII, p. 259, 1918.
9. Barbaudy. — L'eau. Traité de chimie minérale de Paul Pascal et Paul Baud, I, 1931.
10. Bechold. — Die Ausflockung von Suspensionen bzw. Kolloïden und die Bakterienagglutination. *Zeit. Physik Chemie*, XXXXVIII, p. 385, 1904.
11. Besson. — Technique microbiologique et sérothérapique. Baillière, Paris, 1924.
12. Bohlig. — Lieb. Ann. XXI, p. 125, 1863.
13. Boivin. — Le microdosage du carbone par oxydation sulfochromique et le microdosage de l'azote par destruction sulfurique. Technique, résultats, applications biochimiques considérées du point de vue analytique. *Bull. Soc. chim. biol.*, XI, n° 1, p. 1269, 1929.

14. Boland. — Inaug. Dissert. Amsterdam, 1902.

15. Brown (H. C.) et Brown (J. C.). — Further observations on bacterial cataphoresis. *Brit. Journ. Exper. Path.*, XIII, p. 334, 1932.

16. Burke et Gibson. — The Gram reaction and the electric charge of bacteria. *Journ. of Bact.*, XXVI, p. 211, 1933.

17. Cardin. — *Arch. di. Sci. Biol.*, XX, p. 139, 1934.

18. Carlgren. — *Zeit. Allgmein. Physiol.*, V, p. 129, 1905.

19. Carlson. — Uber Geschwindigkeit und Grösse der Hefevermehrung in Würze. *Biochem. Zeit.*, LVII, p. 313, 1913.

20. Chapman. — Electrophoretie potential as and aid in identifynig strains of the B. Coli group. *Journ. of Bact.*, XVIII, p. 339, 1929.

21. Chassevant. — *Travaux du Laboratoire de physiologie de Ch. Richet*, IV, p. 246, 1898.

22. Choucroun (Mlle). — Electrisation d'absorption. Thèse doct. ès sc., Paris, 1923.

23. — Un dispositif correct d'électrophorèse. *C. R. de l'Ac. des sc.*, 196, p. 777, 1933.

24. — L'électrisation superficielle; caractère spécifique des micro-organismes. *C. R. de l'Ac. des sc.*, CCII, p. 1711, 1936.

25. — L'électrisation superficielle; caractère spécifique des bactéries. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CCII, p. 1822, 1936.

26. Choucroun (Mlle) et Plotz. — Différences entre les électrisations de diverses variétés de bacilles tuberculeux. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CIC, p. 165, 1934.

27. Cluzet, Rochaix et Kofman. — Sur le galvanotropisme des microbes. *C. R. Soc. de biol.*, XXXVIII, p. 779, 1923.

28. Codex Medicamentarius Gallicus. Edition 1937, II, p. 282, 283 et 286.

29. Coleman, Fellows et Dixon. — *Cereal Chimistry*, II, p. 132, 1925.

30. Copeaux et Perperot. — Chimie génér., I, Colin, Paris, 1929.

31. Cotton et Mouton. — Les ultramicroscopes. Masson, Paris, 1906.

32. Dale. — Galvanotaxis and chemotaxis of ciliate infusoria. *Journ. of Physiol.*, XXVI, part. I, p. 291, 1900-1901.

33. Damboviceanu. — Caractérisation des formes microbiennes « R » et « S » par leur potentiel électrique. *C. R. de la Soc. de biol.*, CIII, p. 633, 1930.

34. Dangoumeau et Castagnou. — Dosage de l'azote dans les farines. *Bull. de la Soc. de chim. de France*, V, n° 152, p. 1374, 1938.

35. Davis et Wise. — Observations on the precipitation of Mercury in the Kjeldhal methode. *Cereal Chimistry*, VIII, n° 5, p. 349, 1931.

36. Debroise (G.) et Debroise (M.). — Points iso-électriques des protides du sérum. Technique de recherche. Vigot, Paris, 1936.

37. Demenier. — Contribution à l'étude des protéines du sérum sanguin. Recherches analytiques, physiologiques, cliniques et expérimentales. Thèse doct. pharm. Bordeaux, 1934.

38. Denigès, Chelle et Labat. — Précis de chimie analytique. Maloine, Paris, II, p. 57, 1931.

39. Dernby et Avery. — The Optimum hydrogen ion concentration for the growth of Pneumococcus. *Journ. of Exper. Med.*, XVIII, p. 345, 1918.

40. Dold. — Kritische Betrachtungen über die Bestimmung und Bewertung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. *Deut. Med. Wochenschr.*, p. 1851, 1925.

41. Dognon. — Précis de physico-chimie biologique et médicale. Masson, Paris, 1931.

42. — « Les colloïdes », *in* Leçons de physico-chimie de Strohl. Masson, Paris, 1930.

43. Dopter et Sacquepée. — Bactériologie. Baillière, Paris, 1933.

44. Duclaux. — « Les colloïdes »; Gauthier-Villars, Paris, 1929.

45. Dumazert. — Submicrodosage de l'azote dans la matière organique par la méthode de Kjeldahl. *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, XX, n° 12, p. 1405, 1938.

46. Eijkmann. — Uber thermolabile Stoffwechsel produkte als ursache der natürlichen Wachstumshemmung der mikroorganismen. *Centralbl. für Bakt und Par. Orig.*, XXXVII, p. 436, 1904.

47. Faguet. — Contribution à l'étude de la multiplication microbienne (Bact. Coli). *C. R. de l'Ac. des sc.*, 194, p. 1027, 1932.

48. — Une nouvelle méthode d'étude de la multiplication microbienne. *C. R. de l'Ac. des sc.*, 194, p. 1763, 1932.

49. — Etude photométrique de la multiplication microbienne. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CC, p. 498, 1935.

50. — Diagnostic photométrique du bacille d'Eberth, du para-A, du para-B, du colibacille. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CC, p. 1637, 1935.

51. Falk, Gussin et Jacobson. — Studies on respiratory diseases. *Journ. Inf. Dis.*, XXXVII, p. 481, 495 et 499, 1925.

52. Falk et Jacobson. — Studies on respiratory diseases. *Journ. Inf. Dis.*, XXXVII, p. 507, 1925.

53. Falk, Jensen et Mills. — Electrophoresis of Diphteria bacilli. *Journ. of Bact.*, XV, p. 421, 1928.

54. Field et Teague. — *Journ. Exp. Med.*, IX, p. 222, 1907.

55. Folin et Denis. — Nitrogen determination by direct Nesslerisation : I. Total nitrogen in urin; II. Non protein nitrogen in blood. *Journ. of Biol. Chem.*, XXVI, p. 473 et 491, 1916.

56. Friedberger et Ersler. — *Centralbl. für Bakt.*, XLIV, p. 695, 1907.

57. Fries. — Eine einfache Methode zur genaven Bestimmung der Bakteriennengen in Bakteriensuspensionen. *Centralbl. für Bakt. und. Par.*, LXXXVI, p. 90, 1921.

58. Findlay. — *Brit. Journ. Exp. Path.*, XI, p. 190, 1930.

59. Girard. — A propos de l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes. *C. R. de la Soc. de biol.*, LXXXIV, p. 442, 1921.

60. Girard et Audubert. — Les charges électriques des microbes et leur tension superficielle. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 167, p. 264 à 351, 1918.

61. Glynn, Powell, Rees et Cox. — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the wright, the haemocytometer and the plate culture methods. *Journ. of Pathol. and Bact.*, XVIII, p. 379, 1913-1914.

61 *bis*. Golse. — Dosage volumétrique de l'ammoniaque dans les eaux. *Bull. Soc. pharm.*, Bordeaux, I, p. 10, 1925.

62. Govaerts. — Technique de l'étude *in vitro* de l'accolement des microbes aux plaquettes sanguines. *C. R. de la Soc. de biol.*, LXXXII, p. 927, 1920, et LXXXIII, p. 197, 1920.

63. Grundmann. — Ein verfahren zur quantitativen Gewinnung von Bakterientrockensubstanz aus flüssigen Nährboedien. *Centralbl. für Bakt. und Par.*, LXXXIX, p. 318, 1933.

64. Guardabassi. — La diagnosi. Ann. XIV, fasc. 3, 1934.

65. — XXXII Congresso de Soc. ital. med. int., Padova, 1926.

66. — *Riviste di Biologica*, vol. XI, fasc. V-VI, 1929.

67. — *Boll. d'Acad. med. chir. Perugia*, n° 1, 1932.

68. — *Boll. de Sez. Ital. Soc. int. Micro.*, fasc. 3, 1934.

69. Guillermond et Choucroun. — Essai d'électrophorèse à l'intérieur des cellules végétales. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 203, p. 225, 1936.

69 *bis*. Heckscher. — Méthode pour la numération microscopique des bactéries. *C. R. de la Soc. biol.*, LXXXIV, p. 1039, 1921.

70. Hehewerth. — Die Microskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein, und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für Hygiene*, XXXIX, p. 321, 1901.

71. Henri et Cernovodeanu (Mlle). — Détermination du signe électrique de quelques microbes pathogènes. *C. R. de la Soc. de biol.*, LXI, p. 200, 1906.

72. Henriques. — Technique de numération des bactéries. *C. R. de la Soc. de biol.*, LXXXVIII, p. 819, 1923.

73. Hober. — Physik. Chem. der Zelle und der Gewebe, 4e éd., Leipzig, 1914.

74. Hollande et Crémieux. — Méthode de numération directe des bacilles de Koch. *C. R. Soc. de biol.*, IC, p. 122, 1928.

75. Hulett. — *Zeit. Physik Chemie*, XXI, p. 297, 1896.

76. Johnes et Mackay. — *Zeit. Physik Chemie*, XXII, p. 237, 1897.

77. Kahn et Schwarzkopf. — *Amer. Rev. of tuber.*, XXIII, p. 45, 1931.

78. Kligler et Olitzki. — *Brit. J. Exp. Path.*, XII, p. 69, 1931.

79. Klein. — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Centralbl. für Bakt. und Par.*, XXVII, p. 834, 1900.

80. Kober. — Nephelemetry in the study of proteases and nucleases. *Journ. of. Biol. Chem.*, XIII, p. 485, 1913.

81. Kofman. — Signe électrique des microbes. Th. méd. Lyon, 1927.

82. Kolhrausch et Heydweiller. — *Zeit. Physik. Chemie*, XIV, p. 317, 1894.

83. Kopaczewski. — Introduction à l'étude des colloïdes. Gauthier-Villars, Paris, 1926.

84. Kross et Zuelzer. — *Centralbl. für Bakt.*, CXXVI, n° 281, p. 360, 1932.

85. Lasseur, Fribourg et Dupaix. — *C. R. de la Soc. de biol.*, CXV, 1933.

86. Lasseur et Noblat. — Travaux du Laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie, Nancy, 1928.

87. Lasseur et Girardet. — L'eau pure en biologie. *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, VI, p. 314, 1924.

88. Lasseur et Joffroy. — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de pharmacie de Nancy, 1928.

89. Lasseur. — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de pharmacie de Nancy, 1930, 1933.

90. Lasseur et Dupoix (Mlle). — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de pharm. de Nancy, 1930, 1931.

91. Lasseur et Fribourg. — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de pharmacie de Nancy, 1928, 1929, 1930.

92. Lasseur, Fribourg, Olivier et Dupoix. — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de pharmacie de Nancy, 1924.

93. Leishmann. — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health.*, London, XVIII, n° 8, p. 461, 1901 (d'après Glynn).

94. Lépine. — Virus vaccinal et cataphorèse. *C. R. de la Soc. de biol.*, CIV, p. 760, 1930, et CV, p. 282, 1930.

95. Levaditi et Lépine. — Recherche, par la cataphorèse, du virus poliomyélitique dans la moelle de singes atteints de lésions chroniques. *C. R. de la Soc. de biol.*, CVI, p. 34, 1931.

96. Liebreich. — Eine zählkammer für cytologische und bacteriologische zwecke. *Deutch. Med. Wochenschr.*, 1916.

97. Liese et Kleinmann. — Weber ein neues nophelometer und die Prinzipien nephelometrischer. *Messungen. Kolloïd Zeit.*, XXVII, p. 236, 1920.

98. Lisbonne et Seigneurin. — Sur l'électrophorèse des « Brucella ». *C. R. de l'Acad. des sc.*, 196, p. 1747, 1933.

99. Loeb. — Les protéines (traduit de l'anglais par H. Mouton). Alcan, Paris, 1924.

100. Loeb. — La théorie des phénomènes colloïdaux (traduit de l'anglais par H. Mouton). Alcan, Paris, 1925.

101. Lortet. — Influence des courants induits sur l'orientation des bactéries vivantes. *C. R. de l'Acad. des sc.*, CXXII, p. 892, 1896.

102. Luhrig et Sartori. — Gärungshemmungen zuckerhaltgein Lösungen durch Konservierungsmittel. *Pharm. Zentralbl.*, XXXXIX, p. 934, 1908.

103. Marmier et Grysez. — Nouvelle préparation par cataphorèse d'un bactériophage purifié. *C. R. de la Soc. de biol.*, CVII, p. 317, 1931.

104. Mestrezat et Janet (Mlle). — Sur quelques points concernant le dosage précis de l'urée dans le sérum et les humeurs par le xanthydrol. *Bull. de la Soc. de chim.*, III, p. 88, 1921.

105. Michaelis et Marcora. — Die Säure produkticität des Bacterium coli. *Zeit. für Immunitätforschung und Exp. Therap.*, XIV, p. 170, 173, 1912.

106. Michaelis. — Manuel de techniques physico-chimiques. Paris, 1923.

107. Miquel. — Nouvelles recherches sur les poussières organisées de l'atmosphère. *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, IX, p. 386, 1880.

108. Montel. — Variabilité microbienne. *Rev. du Serv. de Santé milit.*, sept. 1939.

109. Mueller. — Studies on cultural requirements of bacteria, IV. Quantitative estimation of bacterial growth. *Journ. of Bact.*, XXIX, p. 383, 1935.

110. Muller. — La pratique électrochimique. Paris, 1923.

111. Mylius et Groschuff. — *Zeit. Anorg. Chem.*, LV, p. 101, 232, 1907.

112. Nattan-Larrier. — Traité de microbiologie. Doin, Paris, 1934.

113. Neipp. — De l'influence de divers cations sur le croît microbien. Thèse de doct. ès sc., Paris, 1937.

114. Neisser et Friedmann. — *Münch. Med. Wochenschr.*, LI, p. 465 et 827, 1904.

115. Nicolau et Kopciowska. — Virus rabique et cataphorèse. *C. R. Soc. de biol.*, CIV, p. 290, 1930, et CVIII, p. 364, 1931.

116. Olitzky et Long. — *Journ. of Exper. Med.*, L, p. 263, 1929.

117. Olitzky. — *Journ. of Immunology*, XXII, p. 251, 1932, et XXIV, p. 505, 1933.

118. Ostwald et Luther. — *Physiko. Chemische Messungen*, 4e éd., p. 532, Leipzig.

119. Paine. — The permeability of the yeast. cell. *Proc. Roy. Soc. of London*, B., LXXXIV, p. 289, 307, 1911-1912.

120. Pfeiffer. — Elektrizitat und Eiweisse insbesondere des Zellplasmas. Dresden, 1929.

121. Parnas et Wagner. — Uber die Ausführung von Bestimmungen Kleiner Sticktoffmengen nach Kjeldahl. *Biochem. Zeit.*, 125, p. 253, 1921.

122. Pohorecka, Lelesz. — Sur le microdosage de l'urée et des sels ammoniacaux par titration à l'hypobromite. *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, VI, p. 773 à 787, 1921.

123. — Sur la méthode de Kjeldahl simplifiée (procédé sans distillation). *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, VII, p. 1038, 1043, 1925.

124. Pregl. — La micro-analyse organique quantitative (traduct. Welter). Les Presses Universitaires, Paris, 1923.

125. Regnard. — Appareil destiné à enregistrer sous forme de courbe continue les phénomènes de fermentation. *C. R. de la Soc. de biol.*, IV, p. 469, 1882.

126. Reimesch. — Zur Frage der quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen nebst einer neuen diesbezüglicen allgemeinen Bestimmungs-methode. *Centralbl. für Bakt. und Par.*, II, abt., LXXXXI, p. 460, 1935.

127. Richet. — Influence d'élévations thermiques faibles et brèves sur la marche des fermentations. *C. R. de l'Acad. des sc.*, 163, p. 954, 1916.

128. Rimattei. — *Revue médicale de France et des colonies*, n° 1 (4e année), janv. 1927.

129. Rosenow. — Vitesse de cataphorèse des streptocoques isolés dans les recherches sur les arthrites. *Presse médicale*, n° 82, 1933.

130. Russ. — *Proc. Roy. Soc.*, London, sér. B, LXXXI, p. 314, 1909.

131. Sabouraud. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques (d'après Calmette, Nègre et Boquet, p. 531).

132. Salimbeni. — Méthode de numération à l'hématimètre (d'après Calmette, Nègre et Boquet, 3e éd., p. 858).

132 *bis*. Schiel. — *Deut. Arch. f. Klin. Med.*, XV, 1885.

133. Seigneurin. — Electrophorèse et conductibilité des suspensions microbiennes. Applications éventuelles à la différenciation des espèces et des races microbiennes. *Rev. de microbiol. appliquée*, III, p. 1, 1937.

134. — Recherche sur la conductibilité et l'électrophorèse des suspensions microbiennes. Thèse doct. en méd., Montpellier, 1935.

135. Sichert et Modrow. — *Centralbl. für Bact.*, CXIX, p. 1, 1930.

136. Sierakowski et Leczycka. — *Centralbl. of Bact.*, CXXVII, p. 486, 1933.

137. Clator. — Yeast crops and the factors which determine them. *Journ. of Chem. Soc.*, CXIX, p. 115, 1921.

138. Smith et Joffe. — *Journ. of Bact.*, XXVIII, p. 127, 1934.

139. Soru (Mlle). — Le potentiel électrique de quelques espèces de vibrions cholériques. *C. R. de la Soc. de biol.*, CXV, p. 1319, 1934.

140. Stass. — *Jahresb*, 134, 1867.

141. Strohl. — *Leçons de physico-chimie*, p. 56 à 57. Masson, Paris, 1930.

142. Szent-Gyorgyi. — *Biochem. Zeit.*, CXIII, p. 29, 1921.

143. Talenti et Leonardi. — *Ann. Igiene*, VL, p. 109, 1935.

144. Teague et Buxton. — *Zeit. Physik Chem.*, LVII, p. 76, 1907.

145. Thornton. — *Proc. Roy. Soc., London*, séries B, LXXXII, p. 638, 1909-1910.

146. Tian. — Thèse Paris et *Ann. de la Fac. des sc. de Marseille*, XXII, fasc. IV, p. 179, 1913.

147. Thoni et Thaysen. — Experimentelle untersuchangen zur Feststellung der Mindestzahl von Bacillen, die Beim Meerschweinchen noch Tuberkulose hervorruft. *Centralbl. für Bakt. and Par.*, LXXVII, p. 308, 1915-1916.

148. Troester. — Werfahren zum zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centralbl. für Bakt. and. Par. origin.*, LXXXVIII, p. 252, 1922.

149. Vles. — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de phys. biol.*, I, p. 189, 1921.

150. — *Précis de chimie physique à l'usage des étudiants en médecine*, p. 143. Vigot, Paris, 1929.

151. Wamoscher. — Bakterien zählung im Dunkelfeld. *Klin. Wochenschr.*, 1927.

152. Winslow, Falk et Caulfield. — *Journ. gen. of Physiol.*, VI, p. 177, 1923-1924.

153. Winslow et Shanghnessy. — *Journ. gen. of Physiol.* VI, p. 697, 1924.

154. Weawer. — Studies on Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus (II. Electrophoresis Studies). *Journ. of Bact.*, XXIV, p. 73, 1932.

155. Wohlfeit. — Vergleichende Untersuchungen zwischen der mikroskopischen Auszählung im Dunkelfed, dem Plattenguszverfahren und der Trockensub. tanzbestimmung. *Centralbl. für Bakt. und Par.*, 127, p. 492, 1933.

156. Wright. — On same new procedures for the examination of the blood and bacterial cultures. *The Lancet*, London, II, p. 11, 1902.

21.454, — Bordeaux, Imprimeries Delmas, 6, place Saint-Christoly. — 1941.